

THESIS MUNICH 1965

Zur Stabilisierung von Rohwurstkeimen durch Trocknung

WALTER DIETERICH



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der
Tierärztlichen Fakultät der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. L. Kotter

ZUR STABILISIERUNG VON ROHWURSTKEIMEN
DURCH TROCKNUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Walter Dieterich
aus
Welzheim

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. Kotter

Referent: Prof. Dr. L. Kotter

Tag der Promotion: 26. 2. 1965

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	
B. Literatur	6
I. Rohwurst	6
1. Begriff	6
2. Funktionen der Mikroflora bei der Reifung	6
3. Keimgehalt von Rohwürsten	7
4. Mikrobielle Rohwurstfehler	8
5. Gezielter Keimzusatz	8
II. Konservierung von Mikroorganismen	10
1. Trocknungsmethoden	10
a) Exsikkatortrocknung	10
b) Einfachtrocknung	10
c) Gefriertrocknung	10
aa) Vorheriges Einfrieren	11
bb) Einfrieren durch Verdunstungskälte	12
cc) Zentrifugalgefriertrocknung	12
d) Konvektionsgefriertrocknung	12
e) Vakuum-Sprüh-Gefriertrocknung	12
f) Sprühtrocknung	12
2. Faktoren, welche die Überlebensrate während Trocknung und Lagerung beeinflussen	12
a) Art der Mikroorganismen	13
b) Ernährung und Alter	13
c) Konzentration der Zellen	14
d) Suspensionsmedium (Schutzlösung)	14
e) Geschwindigkeit und Methode des Einfrierens	14
f) Trocknungsart	14
g) Restfeuchtigkeit	15
h) Lagerung	15
aa) Gasatmosphäre	15
bb) Temperatur	16
cc) Licht	16
dd) Art des Behälters	16
i) Reaktivierung	16

	Seite
aa) Temperatur der Reaktivierungsflüssigkeit	16
bb) Zusammensetzung der Reaktivierungsflüssigkeit	16
j) Untersuchungsmethoden	17
aa) Lebensfähigkeit	17
bb) Biochemische Aktivität	17
cc) Infektiosität	17
dd) Morphologische Veränderungen	18
3. Trocknung spezieller Stämme	18
C. Eigene Untersuchungen	19
I. Methodik	19
1. Überblick	19
2. Material	19
3. Trocknungsarten	19
4. Untersuchung der Keime	19
5. Lagerung	20
II. Versuche	20
1. Zentrifugalgefriertrocknung	
Versuch Nr. 1 - 15	20
2. Einfachtrocknung	
Versuch Nr. 16 - 21	23
3. Gefriertrocknung: Modell Regensburg	
Versuch Nr. 22 - 24	25
4. Gefriertrocknung: Laboranlage	
Versuch Nr. 25 - 28	25
5. Tabellarische Zusammenfassung	29
6. Besprechung der Ergebnisse	33
D. Diskussion	34
E. Zusammenfassung	37
F. Literaturverzeichnis	38

A. Einleitung

Gewisse Fleischwaren unterliegen im Verlauf des Herstellungsprozesses einer überwiegend mikrobiell-fermentativen Reifung. Der für diese Reifung erforderliche Initialkeimgehalt wird durch die Bearbeitung des Fleisches und durch die Qualität der Zusatzstoffe bestimmt. Damit ist er bis zu einem gewissen Grade zufallsbedingt und dementsprechend kann die Reifung auch variabel verlaufen.

Um den Zufall auszuschalten und die charakteristischen Eigenschaften der gereiften Fleischwaren, insbesondere der Rohwürste, in optimalem Maße zur Ausbildung kommen zu lassen, wird seit geraumer Zeit der gezielte Einsatz von "Starterkulturen" erprobt. Da aktive, also junge Kulturen zeitlich nur sehr begrenzt angewendet werden können, ist, um sie der allgemeinen Verwendung nutzbar zu machen, ein Stabilisierungsverfahren erforderlich, wozu sich die Trocknung anbietet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher verschiedene Trocknungsverfahren auf ihre Eignung für eine Stabilisierung von Rohwurstkeimen geprüft werden, wobei primär die Überlebensrate der Keime und deren fermentative Aktivität nach Trocknung und Lagerung berücksichtigt werden sollten.

B. Literatur

I. Rohwurst

1. Begriff

Rohwürste sind nach K o t t e r und P r ä n d l (1958) roh zum Verkauf gelangende, streichfähige oder schnittfeste Wurstwaren, die im Gegensatz zu den rohen Bratwürsten einem Trocknungsprozeß und meist auch einer Rauchbehandlung unterzogen werden und deshalb eine gewisse Haltbarkeit aufweisen. Diese Definition bedarf noch einer gewissen Ergänzung, indem die Kriterien der fermentativen Prozesse (Deibel 1961 a) und der Konservierung (N i i n i v a a r a 1955 a) zu respektieren sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen allerdings nur Vorgänge bei schnittfesten Rohwürsten besprochen werden.

2. Funktionen der Mikroflora bei der Reifung

Die Rohwurst ist ein durch fleischeigene Enzyme und Bakterientätigkeit gereiftes Erzeugnis. Über die bakteriellen Vorgänge haben N i i n i v a a r a (1955 a), P o h j a (1960) und T e r p l a n (1962) umfassende Arbeiten veröffentlicht.

N i i n i v a a r a (1955 a) teilt die Mikroflora der Rohwurst in unerwünschte und erwünschte Bakterien ein, wobei die ersteren zu Fehlprodukten führen können. Die Erwünschten sollen bei der Rohwurstreifung

Umrötung und Farbhaltung (durch den Nitratabbau bis zum Myochromogen),

Säuerung (durch Milchsäurebildung),

Hemmung von Fäulnisbakterien sowie

Aroma- und Geschmacksbildung

positiv beeinflussen. N i i n i v a a r a ' s Untersuchungen über die Mikroflora sind in einer Reihe von sehr gründlichen Arbeiten zusammengefaßt (1955 a, b; et al. 1956; et al. 1957 a, b, c), auf die z.T. noch näher eingegangen wird. T e r p l a n (1962) hat über die biologischen, chemischen und physikalischen Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren eine Darstellung mit mehr als 600 Literaturangaben gegeben.

Weitere kürzere Arbeiten, die sich allgemein mit mikrobiellen Vorgängen befassen, stammen von S c h o r m ü l l e r (1954), L e r c h e (1956), C o r e t t i (1958 d), B a r t h (1960) und W e i l h ä u s e r (1963).

Schormüller und Schilling (1963) berichten über nitrat-reduzierende Mikroorganismen. Kohnle (1953) hat aromabildende, halophile Bakterien untersucht, die von Meyer (1954) in praktischen Versuchen erprobt wurden. Optimales Aroma erhielt Kellner (1954 a) durch Züchtung der Keime und Lagerung der Rohwurst bei 12°C. Positive Ergebnisse bei der Aromabildung erzielte Lohsem (1956), indem er die Wurstmasse mit $1,3 - 8 \times 10^6$ Keimen/kg inokulierte, und zwar verwendete er den aromabildenden Stamm Nr. 25 c von Kohnle (1953). Nach Wettach (1955) beeinflusst ein übergroßer Anteil an Hefen zwar etwas den Geschmack, aber nicht die Haltbarkeit der Produkte.

3. Keimgehalt von Rohwürsten

Nicht auf absolut hohe Keimzahlen kommt es an, sondern auf die verschiedenen Arten von Keimen (ten Cate 1960 a, Niinivaara et al. 1956). In der Literatur sind häufig Angaben über Keimgehalte zu finden; Coretti (1956) hat besonders umfangreiche und über längere Zeit laufende Untersuchungen vorgenommen:

	Gesamtkeimzahl		Hefen/g		Schimmelpilze/g
	in Mill./g 18°C	25°C	"Umrötung" bei 18°C	25°C	"Umrötung" bei 25°C
"Brät"	4	4	2000	2000	800
nach "Umrötung"	28	72			
nach Räucherung	152	154	4000	32000	
nach 2 Wochen	292	301			
" 4 "	173	114			
" 6 "	144	181			15000
" 10 "	93	67			

Bei der qualitativen Auswertung der Mikroflora fand Coretti (1956) in der Rohwurstmasse überwiegend Laktobazillen und Mikrokokken, in wesentlich geringeren Mengen Enterokokken, Gattung Bacillus ("Subtilis-Mesentericus-Keime"), Corynebakterien, Schimmelpilze, Hefen und systematisch nicht einzuordnende, grampositive Kokken, die Katalase bildeten. Durch Räucherung, p_H -Abfall, Hydroxylaminbildung, Abtrocknung und steigende Kochsalzkonzentration änderten sich die Keimarten sehr stark und er wies in gut abgetrockneten Rohwürsten fast ausschließlich Laktobazillen und Streptokokken nach. Nach Coretti's Ansicht kann aus dem bakteriologischen Befund einer gelagerten Rohwurst nicht auf etwaige bakterielle Fehlleistung während der Herstellung geschlossen werden.

4. Mikrobielle Rohwurstfehler

Bei der Bearbeitung in Fleischereibetrieben sind die Kontaminationsmöglichkeiten des Wurstgutes mit Keimen sehr vielseitig und der Anfangskeimgehalt daher bis zu einem gewissen Grade zufallsbedingt.

Den Gewürzen wurde ursprünglich von H o b b i n g (1935) noch eine Bedeutung auf Grund ihrer keimhemmenden und ranzigkeitswidrigen Wirkung beigemessen, die aber nur bei Anwendung von großen Dosen zu beobachten ist. Bereits H i l l e (1937) stellte durch den Zusatz von Gewürzen eine Erhöhung des Keimgehaltes fest.

S c h ö n b e r g (1952 b) hat das einschlägige Schrifttum zusammengetragen. In eigenen Untersuchungen stellte er Fehlfabrikate bei Rohwürsten fest, die sich eindeutig auf den Keimgehalt der Gewürze zurückführen ließen. Zur Entkeimung der Gewürze und Verarbeitungsräume empfiehlt er (1952 a, b) die UV-Strahlung. Das Ergebnis befriedigte nicht; G i B k e (1954) verwendete daher "Ersatzgewürze", die aus Extrakten der natürlichen Gewürze und Dextrose als Trägerstoff bestehen. Über 100 Einzelgewürze hat C o r e t t i (1955) bakteriologisch untersucht und als höchsten Keimgehalt pro g bei schwarzem Pfeffer 100 Millionen Keime ermittelt. Die oben genannten Autoren sowie L e r c h e (1953) und H r u b y et al. (1959) empfehlen aus den erwähnten Gründen die Verwendung von keimarmen oder keimfreien Gewürzen.

Über bakteriell verursachte Rohwurstfehler berichten unter anderen K e l l e r (1953), G i B k e (1956), C o r e t t i (1958 a, b, c) und S k o v g a a r d (1963). Über tatsächliche wirtschaftliche Verluste durch Rohwurstfehler gibt es keine Zahlenangaben und keine Schätzungen, da nach R i e v e l (1954) auf eine Umfrage bei den Fleischerverbänden von den Metzgereien keine Fehlfabrikate gemeldet wurden. Daß sie trotzdem vorhanden sind, geht eindeutig aus den zahlreichen Anfragen im Leserteil der Fleischereifachzeitschriften über Schwierigkeiten bei der Rohwurstherstellung hervor.

5. Gezielter Keimzusatz

Am frühesten haben die amerikanischen Fleischforscher die positive Bedeutung der Bakterien bei der Rohwurstherstellung erkannt (K u r k 1921; D r a k e 1928; J e n s e n et al. 1940). Die Beimpfung der Rohwurstmasse mit dem stark zuckerreduzierenden *Pedococcus cerevisiae* wurde von N i v e n et al. (1955, 1958) empfohlen. D e i b e l et al. (1961 b) lyophilisierten den Stamm für die industrielle Anwendung.

Auch in Deutschland wurden Versuche zur mikrobiellen Beeinflussung der Rohwurst unternommen (K o h n l e 1953; M e y e r 1954; K e l l e r 1954

a, b, 1955; L o s e m 1956), die aber immer nur auf einzelne Eigenschaften wie Aromabildung oder Haltbarkeit ausgerichtet waren.

Auf sehr gründliche Untersuchungen gestützt (N i i n i v a a r a 1955 a, b; et al. 1956; et al. 1957 a, b, c; P o h j a et al. 1957; 1960; et al. 1964), haben N i i n i v a a r a und P o h j a das Problem des Keimzusatzes angegangen und mit dem Mikrokokkenstamm M 53 umfangreiche Rohwurstbeimpfungen durchgeführt. Umrötung und Säuerung traten bereits nach der halben Zeit ein. P o h j a (1960) hat Kriterien aufgestellt, die für Mikrokokkenstämme als Starterkultur gelten: Halotoleranz, Glukosefermentation und Nitratreduktion. Durch die Nitratreduktion und die anschließende rasche Säuerung wird das entstandene Nitrit weiter abgebaut zu Stickoxyd und bildet mit dem Myoglobin über Nitrosomyoglobin das stabile Pökelrot, Nitrosomyochromogen. Auch hier handelt es sich nur um eine Seite des Problems, nämlich zu einer schnellen und sicheren Umrötung zu kommen.

L e r c h e (1956) und E c k e r t (1958) schlagen die Anwendung von Keimkombinationen vor. T e r p l a n (1962) hat Brät mit einem Gemisch von Mikrokokken, Achromobactern und Hefen inokuliert und zwar mit mindestens 10^8 Keimen pro g.

Eine in fleischverarbeitenden Betrieben verwendbare Starterkultur "Baktofermente" empfiehlt P f ü t z n e r (1959). Es handelt sich dabei um den Mikrokokkenstamm M 53 (N i i n i v a a r a 1955 a) auf einem festen Nährboden. Inzwischen ist das Präparat (angeblich mit einem neuen Mikrokokkenstamm) als "Baktofermente 61" in lyophilisierter Form mit Dextrose vermischt im Handel.

Über bisherige Erfolge und Mißerfolge, die in der Literatur beschrieben sind, berichtet t e n C a t e (1960 b) und empfiehlt Lancefeld D-Streptokokken als Erreger des typischen Rohwurstaromas. N i i n i v a a r a et al. gaben (1964) einen Überblick über ihre Erfahrungen mit der Anwendung von Reinkulturen bei der Rohwurstfabrikation.

Bis heute sind oder waren neben den bereits erwähnten "Baktofermente" auch andere Starterkulturen im Handel. So wird in Amerika der gefriergetrocknete *Pediococcus cerevisiae* als "Accel" in der Industrie eingesetzt, aber nur bei Würsten, die mit Nitritzusatz hergestellt werden. Die durch den Zuckerabbau sehr schnell auftretende Säure tötet die nitratreduzierenden Mikrokokken ab. Ein lyophilisierter Lactobazillenstamm wird in Frankreich als "Ferment 411" vertrieben und eine Mikrokokkenkultur als "Equinitre", die dem deutschen Baktoferment 61 entspricht.

II. Konservierung von Mikroorganismen

Im Rahmen der grundlegenden Forschungen über Seuchenerreger in der Anfangszeit der Bakteriologie wurde auch geprüft, wie lange Keime an der Luft überleben können. Guanieri (1888), Berkholz (1889), Germaño (1897) und Ficker (1898) trockneten die Keime im Labor an der Luft und im Exsikkator. Bei raschem Wasserentzug im Exsikkator wiesen die Erreger längere Überlebenszeiten auf. Ficker (1898) beobachtete, daß in Blut oder Eiter gebettete Bakterien viel länger lebensfähig blieben als Kontrollproben ohne diese kolloidalen Lösungen.

Alle heutigen Konservierungsverfahren für Bakterien, Hefen und Viren beruhen auf der Trocknung. Das Leben soll dabei in einen stabilen Zustand, eine Art "Totenstarre", ähnlich dem der Spore, gebracht werden, aus dem es durch Wasserzusatz jederzeit wieder erweckt werden kann.

1. Trocknungsmethoden

a) Exsikkatortrocknung

Von Ficker (1898), Kirstein (1900) und Heim (1905, 1907) wurden Bakterienkulturen im Exsikkator unter Anwendung von hygroskopischen Mitteln getrocknet. Heim erreichte z.B. bei *Micrococcus tetragenus* bereits eine Lagerzeit von 5 Jahren. Mit dieser Methode wurden die ersten Konservierungsversuche gemacht.

b) Einfachtrocknung

Durch Anlegen von Vakuum an den Exsikkator entwickelte Brown (1925, 1926, 1932) die Einfachtrocknung. Um dem Trockengut den Wasserdampf schneller zu entziehen, werden neben hygroskopischen Mitteln und Vakuum Kühlfallen und Kondensatoren verwendet. Mit diesen Versuchsanordnungen arbeiteten Otten (1927, 1930), Leifson (1936), Stamp (1947), Maister et al. (1958) und Blum (1950), wobei sie durch Aufschwemmung der Bakterien in verschiedenen Schutzlösungen unterschiedliche Überlebensraten erzielten; Rogers (1914) nahm dazu als erster Magermilch.

c) Gefriertrocknung

Parallel mit der Einfachtrocknung lief die Entwicklung der Gefriertrocknung. Bei diesem Verfahren wird das Material zuerst eingefroren, um dann das Wasser bei Temperaturen unter 0°C abzusublimieren. Der Vorteil besteht darin, daß das Wasser direkt vom festen in den gasförmigen Zustand übergeht, ohne daß während der Trocknung Konzentrationsänderungen und damit chemische und physikalische Reaktionen auftreten.

Eine umfassende Literaturzusammenstellung über die Lyophilisation oder Gefriertrocknung hat H e c k l y (1961) erarbeitet. Der genaue Ursprung des Ausdrucks "lyophilisieren" ist unklar. F l o s d o r f et al. (1935) und R e i c h e l (1936) beschrieben die Behandlung dessen, was sie als "lyophilen" Zustand von biologischen Substanzen bezeichneten.

A l t m a n n (1890) wandte die Gefriertrocknung als erster bei histologischen Arbeiten an; S h a c k e l l (1909) trocknete empfindliche biologische Substanzen. Als erste lyophilisierten H a m m e r (1911) und S w i f t (1921) Bakterien. Zum eigentlichen Durchbruch dieser Methode in der Bakteriologie verhalfen ihr G e r s h (1932) und F l o s d o r f et al. (1935) mit der Einführung leistungsfähiger Vakuumpumpen. Die vollständige geschichtliche Entwicklung kann bei F l o s d o r f (et al. 1945, 1954) und speziell für Bakterien bei F r y (1954) nachgelesen werden.

Über Grundlagen des Trocknens, Temperatureinwirkung auf Zellen sowie Lyophilisieren berichten C a r m a n (1948), F l o s d o r f (1949), N e u m a n n (1955 a, b, 1957), P r e c h t et al. (1955), H a r r i s (1956), P l a n k (1960), R o w e (1960) und S t e p h e n s o n (1960).

Vergleichende Untersuchungen zwischen Einfachtrocknung und Gefriertrocknung stellten S c h m i d t et al. (1958), F e l d m a n n (1959) und S c h e i b n e r (1961) an. S c h m i d t et al. (1958) haben bei 100 verschiedenen Stämmen direkt nach der Trocknung sowie nach halbjähriger Lagerung bei Zimmertemperatur höhere Überlebensraten bei der Einfachtrocknung festgestellt. Nach F e l d m a n n (1959) traten bei 1471 geprüften Merkmalen keine Änderungen in den Eigenschaften der Stämme auf.

In der Bakteriologie ist von den Stabilisierungsverfahren die Gefriertrocknung heute am weitesten verbreitet. Von H a r r i s (1954) und P a r k e s (1960) wurde der jeweilige Stand der Forschung eingehend dargelegt. Die einzelnen Verfasser trocknen nach unterschiedlichen Vorbereitungen:

aa) Vorheriges Einfrieren:

Vor dem Trocknen mit Vakuum wird das Medium eingefroren, und zwar als ganzer Block im jeweiligen Behälter oder in dünnen Schichten als sogenanntes shell- (F l o s d o r f et al. 1945) oder spin-freezing (G r e a v e s 1954) oder in Form von Pellets (G r a h a m et al. 1958/59), wobei man das Medium in eine Kühlflüssigkeit (z.B. Frigen) tropfen läßt und dabei tiefgefrorene Kugeln mit etwa 6 mm Durchmesser erhält.

Dieses Verfahren wird von den einfachsten Laborgeräten bis zu Industrieanlagen angewendet, aus deren Vielzahl hier nur einige Systeme aufgeführt werden: E l s e r et al. (1935), F l o s d o r f et al. (1935), S w i f t (1937),

Barrat et al. (1950), Scheer (1952/53), Fey et al. (1960) und Rhian et al. (1957).

bb) Einfrieren durch Verdunstungskälte (Snap Freezing):

Durch vorsichtiges "Einschleichen" des Vakuums wird die zu trocknende Flüssigkeit entgast und gefriert dann durch die entstehende Verdunstungskälte schlagartig (Flosdorf et al. 1938 und Dobberstein 1960).

cc) Zentrifugalgefriertrocknung:

Sie entspricht dem Snap Freezing, nur daß statt des vorsichtigen Entgasens das Aufschäumen des zu trocknenden Mediums durch die beim Rotieren auftretende Zentrifugalkraft verhindert wird und an der Wand der Ampullen gefriert (Greaves 1944).

d) Konvektionsgefriertrocknung

(Circulating-gas-freeze-drying)

Das zu trocknende Material wird in dünnen Schichten oder als Pellets eingefroren und ohne Vakuum nur durch Luftumwälzung (Mitführen = Konvektion des Wassers) und Flächenkondensator getrocknet. Mit diesem Verfahren erreichten Graham et al. (1958/59), Meryman (1959), Drefahl (1960), Loewus et al. (1960) und Wagman et al. (1963) signifikant höhere Überlebensraten.

e) Vakuum-Sprüh-Gefriertrocknung

Sie wird von Greaves (1962) beschrieben. Das Medium wird versprüht und gefriert in sehr kleinen Tröpfchen, die sehr schnell trocknen können.

f) Sprühtrocknung

Zur Herstellung von Trockenmilch wird sie in der Milchwirtschaft schon lange gebraucht (Campbell 1954 a, b). In der Bakteriologie wird sie noch nicht angewandt, aber der Keimgehalt von Milchpulvern zeigt, daß Bakterien gut überleben (Hiscox 1945). Es ist ein einfaches und schnelles Verfahren für große Flüssigkeitsmengen ohne vorhergehende Eindickung.

2. Faktoren, welche die Überlebensrate während der Trocknung und Lagerung beeinflussen

Beim Einfachtrocknen und Lyophilisieren sind die Keime verschiedenen Noxen ausgesetzt:

Das Einfrieren: Durch Eiskristallbildung können die Zellen mechanisch geschä-

diget werden; thermische Ausdehnung kann die Zellen sprengen; die gelösten Stoffe können auf Grund des Konzentrationsanstiegs durch Wasserentzug toxisch wirken.

Das Vakuum: Die Keime scheinen vakuumempfindlich zu sein, denn während der Vakuumtrocknung treten die größten Keimzahlverluste auf.

Die Lagerung: Auf Grund der noch vorhandenen Restfeuchtigkeit sind biochemische Reaktionen möglich, die durch Licht, Sauerstoff und Lagerungstemperatur stark beeinflussbar sind.

Die Reaktivierung: Um die Keime wieder in ihre normale vegetative Form zu versetzen, wird Wasser zugegeben; bei der Wasseraufnahme wirken dann ähnliche Konzentrationsänderungen wie beim Einfrieren.

Die Vielzahl der oben beschriebenen Trocknungsverfahren ist dadurch zu erklären, daß von den Forschern versucht wurde, die einzelnen Noxen zu umgehen.

Im folgenden wird die Literatur über die Faktoren zusammengestellt, von denen die Überlebensrate der konservierten Keime abhängt.

a) Art der Mikroorganismen

Aus den Untersuchungen von Stark et al. (1931), Stamp (1947), Wickerham et al. (1946), Proom et al. (1949; 1951 a, b), Kirsop (1955), Haynes et al. (1955), Schmidt et al. (1958) und Feldmann (1959) geht klar hervor, daß nicht alle Mikroorganismen die Trocknung gleich gut überstehen. Heckly (1961) führt Absterbetheorien an, bei denen aber die physikalischen und biochemischen Besonderheiten der trockenungsempfindlichen und trockenungsresistenten Keime nicht berücksichtigt sind.

Haynes hat über Erfahrungen berichtet, die er bei der Trocknung der NURB Culture Collection gemacht hat, wobei sehr unterschiedliche Empfindlichkeiten festgestellt wurden; manche Keime wiesen beim Lagern keinerlei Stabilität auf. Feldmann hat an 100 Bakterienstämmen ähnliche Erfahrungen gewonnen. In beiden Fällen wurde unter gleichen Bedingungen getrocknet, so daß innerhalb der Arbeiten Vergleiche zwischen den einzelnen Keimen möglich sind. Das Mengenverhältnis bei lyophilisierten Mischkulturen ändert sich nach Greaves (1960) sehr stark.

b) Ernährung und Alter

Die Mikroorganismen werden auf jeweils optimalen Nährmedien gezüchtet, um Schädigungen bei der Trocknung besser zu überstehen. Nach Heckly (1961) sollen junge, nach Fry et al. (1951) nicht zu junge Kulturen zur Trocknung genommen werden; dann ergeben sich nach dem Trocknen die günstigsten Überlebensraten.

c) Konzentration der Zellen

O t t e n (1930) und F r y et al. (1951) machen prozentuale Angaben der Überlebensraten und stellen unter anderem fest, daß bei hoher Zellkonzentration die Ergebnisse um einige Zehnerpotenzen höher lagen als bei verdünnten Aufschwemmungen. 10^{10} bis 10^{11} Keime pro ml des zu trocknenden Gutes sieht H e c k l y (1961) als optimal an.

d) Suspensionsmedium (Schutzlösung)

Auf Grund von Erfahrungen hat sich herausgestellt, daß großmolekulare, kolloidale Lösungen die Überlebensrate besonders günstig beeinflussen. Mit Magermilch haben R o g e r s (1914), H o r n i b r o o k (1950) und H e c k l y et al. (1958) gearbeitet. W i c k e r h a m et al. (1946) und R h o d e s (1958) trockneten die Bakterien und Hefen mit Serum. F r y et al. (1951) empfehlen "mist. desicans" (3 Teile Serum, 1 Teil Bouillon, mit 7,5 % Glukose). N a y l o r et al. (1946) arbeitete mit einem schützenden Kolloid und einem zusätzlichen Antioxydans (Naylor-Smith-Solution). G r e a v e s (1956) beschreibt ein Schutzkolloid aus Dextran, Pepton, Glukose und Triton, das in ähnlicher Zusammensetzung für M u g g l e t o n et al. (1958) patentiert wurde. Die Firma Leybold (1962) hat sich den Gelatinezusatz bis 10 % patentieren lassen. Zu den Lösungen werden häufig weitere Stoffe zugesetzt, die bei Trocknung oder Lagerung einen günstigen Einfluß haben sollen. So schützt z.B. ein Zusatz von 5 - 10 % Glukose vor Übertrocknung. Die einzelnen Schutzkolloide lassen sich nicht miteinander vergleichen, sie müssen für optimale Überlebensraten bei jedem Stamm getestet werden.

e) Geschwindigkeit und Methode des Einfrierens

Bei schnellem Einfrieren in wäßriger Lösung stellte H a i n e s (1937/38) eine konstante Absterberate fest. S t i l l e (1948/50) hält es für ein Zufallsgeschehen. Über die Unterschiede zwischen langsamem Einfrieren, bei dem die Keime vorsichtig gekühlt werden, und sehr raschem, wodurch sich nur kleine Eiskristalle und keine Konzentrationsverschiebungen ergeben sollen, berichten P r o o m et al. (1949), L u y e t (1951, 1960 a, b), M e r y m a n (1957) und H ö r t e r (1957/58). Differenzen zwischen den Ergebnissen können nur mit der verschiedenen Kälteempfindlichkeit der jeweils getrockneten Keime erklärt werden.

f) Trocknungsart

Aus gefrorenem Zustand lyophilisierten unter anderen M u g g l e t o n (1960) und S c h m i d t et al. (1958), aus flüssigem, nicht gefrorenem Zustand trockneten F r y (1954), G r e a v e s (1944), S c h m i d t et al. (1958) und B l u m (1950). Von diesen Autoren hat S c h m i d t

100 Stämme der Einfachtrocknung und Gefriertrocknung unterzogen und kam bei diesem Vergleich zu einer leichten Überlegenheit der Einfachtrocknung.

Graham et al. (1958/59), Meryman (1959), Drefahl et al. (1960) und Wagman et al. (1963) sehen nicht das Einfrieren der Keime als starke Noxe an, sondern das Vakuum. Sie beobachteten, daß die Absterberate während der Vakuumtrocknung am größten war und trockneten daher gefrorene Pellets bei Atmosphärendruck. Dabei erreichten sie Überlebensraten von 90 - 100 % (Circulating-Gas-Freeze-Drying).

g) Restfeuchtigkeit

In der ersten Phase der Trocknung verringert sich der Wassergehalt rasch auf etwa 15 %, in der zweiten Phase geht es dann wesentlich langsamer und man beschleunigt die Trocknung durch Aufheizen des Trockengutes, wobei Flossdorf et al. (1937) zu bedenken gibt, daß bei Temperaturen über 50°C außer Wasser noch andere Substanzen verdunsten. Normalerweise wird auf etwa 30 - 35°C erwärmt. Der Restfeuchtigkeitsgehalt beeinflußt nach Watts (1945), Stamp (1947), Fry et al. (1951) und anderen die Überlebensrate. Bei gefriergetrockneten Keimen liegt der Endwert der Restfeuchtigkeit zwischen 1 % und 5 %. Über die genaue Bestimmung und den Einfluß auf das Überleben der Keime berichten Stillman (1951), Willits (1951), Beckett (1954), Baker (1955), Scott (1958) und Rey (1962). Nach Muggleton (1960) ist ein vollkommener Wasserentzug unvereinbar mit dem Leben. Bei seiner Konvektionstrocknung beläßt er die Restfeuchtigkeit bei 10 - 15 %; leider sind bis jetzt noch keine Ergebnisse über die Keimzahlen nach längerer Lagerung erschienen.

h) Lagerung

Die Lebensfähigkeit von gefriergetrockneten Bakterien hält Stark et al. (1931) für unbegrenzt, was bis jetzt noch nicht bewiesen oder widerlegt ist. Fausque et al. (1950) z.B. hat nach 18jähriger Lagerung noch keine Veränderung der biologischen Eigenschaften feststellen können. Elser et al. (1935) haben nach 20 Jahren Überleben festgestellt, geben allerdings nicht an, um welche Stämme es sich handelt.

aa) Gasatmosphäre:

Rogers (1914) war einer der ersten Forscher, der die Lagerung unter Vakuum mit der Aufbewahrung unter verschiedenen Gasen verglich. Mit Vakuum erreichte er die höchsten Überlebensraten, dann folgt Stickstoff. Bei Lagerung in Anwesenheit von Luft oder reinem Sauerstoff ergaben sich die wenigsten überlebenden Zellen. Naylor et al. (1946) bestätigten diese Ergebnisse und Scott (1958) sieht die Wirkung der Gasatmosphäre nicht nur im Zusam-

menhang mit der Keimart, sondern auch mit dem gewählten Schutzkolloid und dem Restfeuchtigkeitsgehalt.

bb) Temperatur:

Normalerweise wird bei Zimmertemperatur gelagert, die meisten Organismen zeigen jedoch höhere Überlebensraten, wenn bei 4°C gelagert wird. Rogers (1914) zeigte dies an Milchsäurebakterien, Maister et al. (1958) und Hecly et al. (1958, 1960) kommen zu gleichen Ergebnissen, während bei Rhodes (1958) nach 10 Jahren die Lagerungstemperatur keinen Einfluß erkennen ließ.

cc) Licht:

Über die Wirkung von Strahlung auf getrocknete Bakterien gibt es sehr wenig vergleichbare Arbeiten. Da ultraviolettes Licht Mikroorganismen abtötet, wird normalerweise dunkel gelagert. Bei Miller et al. (1944) starben Meningokokken im Licht nach 30 Stunden, im Dunkeln dagegen erst nach 9 - 10 Tagen ab. Eine interessante Beobachtung machte Fry et al. (1951): Auf einem Demonstrationsbrett festgetrocknete Bakterien lebten noch nach 6 Monaten trotz Einwirkung von Sonnenlicht.

dd) Art des Behälters:

Gewöhnlich werden lyophilisierte Kulturen in Glasampullen oder Röhrchen verschmolzen. Hecly et al. (1958, 1960) verwendeten Flaschen mit Gummistopfen, die Heller (1941) zusätzlich noch mit Harz abdichtete. In neuerer Zeit werden für gefriergetrocknete Substanzen auch Aluminium und Kunststoffolien verwendet. Wenn die Behälter das Vakuum über lange Zeiten halten, üben sie keinen Einfluß auf die Überlebensrate aus.

i) Reaktivierung

aa) Temperatur der Reaktivierungsflüssigkeit:

Hiscox (1945) zeigte an Hand von sprühgetrockneter Milch, daß mehr Zellen überlebten, wenn er mit Wasser von 50°C reaktivierte; Sant et al. (19) hält 37°C und Leach (1959) Wasserdampf für günstiger, um die Keime durch sogenanntes "Schocken" aus ihrem Ruhezustand zu wecken.

bb) Zusammensetzung der Reaktivierungsflüssigkeit:

Üblicherweise wird destilliertes Wasser zugesetzt, weil beim Trocknen unter 50°C nur Wasser verdunstet. Weiss (1957) empfiehlt die Verwendung eines Nährmediums, aber eine universelle Reaktivierungsflüssigkeit gibt es nicht.

j) Untersuchungsmethoden

N e u m a n n (1955 a) stellt fest, daß durch ungenaue Untersuchung der Keime vor und nach der Trocknung in den letzten 20 Jahren viel Arbeit mit nur geringem Nutzeffekt geleistet wurde.

aa) Lebensfähigkeit:

Von A p p l e m a n et al. (1946), S t o c k t o n et al. (1950), S t e i n (1954) und vielen anderen wurden keine Keimzahlen ermittelt. P r o o m et al. (1949) trocknete über 1500 Stämme, gibt aber die Überlebensraten nur in Prozent und nicht in absoluten Keimzahlen an. Genaue Ergebnisse stammen von F r y et al. (1951), H ö r t e r (1960) und W a g m a n et al. (1963), die in dieser Literaturbesprechung nicht wiedergegeben werden können.

Nährböden, auf denen bestimmte Keime gewöhnlich gutes Wachstum zeigen, müssen sich nach S t r a k a et al. (1959) nicht auch für die gleichen lyophilisierten Zellen eignen.

A n n e a r (1954), B e r g m a n n et al. (1957) und T a n g u a y (1959) berichten über ein Phänomen, daß nach der Trocknung und teilweise auch nach der Lagerung die Überlebensraten weit über 100 % lagen, wobei für die Keime keine Zeit für Teilungen vorhanden war. Die Autoren fanden keine Erklärung hierfür.

bb) Biochemische Aktivität:

In einigen Fällen ist die biochemische Aktivität von getrockneten Präparaten von größerer praktischer Bedeutung als die Zahl der lebenden Zellen. S w i f t (1921) und E i d u s o n et al. (1952) wollen bei lyophilisierten Bakterien Veränderungen der biochemischen Eigenschaften festgestellt haben, die aber erst nach mehreren Überimpfungen auftraten. Eingehende Untersuchungen von S c h m i d t et al. (1958) und F e l d m a n n (1959) an 100 Stämmen hinsichtlich ihrer biochemischen Merkmale, im Durchschnitt 14 pro Stamm, ergaben durch die Trocknung keine einzige Änderung der Eigenschaften. Unter anderem berichtet J a n u s z e w i c z (1957) sogar über erhöhte biochemische Aktivität.

cc) Infektiosität:

Nach S w i f t (1937), S t a m p (1947), S t o c k t o n et al. (1957) und S t e i n (1954) haben pathogene Keime auch nach längerer Lagerung ihre Infektiosität nicht verloren.

dd) Morphologische Veränderungen:

N e i (1960) berichtet über morphologische Veränderungen durch das Gefrieren. Detailuntersuchungen müßten im Verlaufe der Gefriertrocknung mit dem Elektronenmikroskop gemacht werden.

3. Trocknung spezieller Stämme

P r o o m et al. (1949) lyophilisierte über 1500 Stämme, H a y n e s et al. (1955) die NURB Culture Collection, R h o d e s (1958) trocknete Bakterien, Viren, Hefen und Schimmelpilze, S c h m i d t et al. (1958) und F e l d m a n n (1959) untersuchten 100 verschiedene Stämme vor und nach der Trocknung. Mit der Konservierung von Brucellen befaßten sich H u t t o n et al. (1951), H e c k l y et al. (1960) und S c h e i b n e r (1961). Über ihre Ergebnisse mit *Serratia marcescens* berichteten W a s s e r m a n n et al. (1957, 1958), B e n e d i c t et al. (1958) und M a i s t e r et al. (1958). M i l l e r et al. (1953), H a s s (1955) und M u g g l e t o n (1960) befaßten sich mit BCG-Kulturen. Ferner arbeiteten S p e c k et al. (1946) und N y m o n et al. (1945) mit Streptokokken, W e i s e r et al. (1947) mit *Pasteurella pestis*, B r a d y (1960) mit Hefen, S i m o n et al. (1963) mit *Salmonella typhimurium* und D e i b e l et al. (1961 b) mit *Pedilococcus cerevisiae*.

C. Eigene Untersuchungen

I. Methodik

1. Überblick

Zur Trocknung der Keime wurden verschiedene Methoden und Gerätemodelle verwendet. Die aus Rohwürsten gezüchteten Stämme wurden getrocknet. Wachstum und biochemische Eigenschaften der Keime wurden quantitativ bestimmt, und zwar vor und nach der Trocknung sowie nach Lagerung. Verschiedene Schutzkolloide wurden mit wechselnden Zusätzen ausprobiert und verglichen.

2. Material

Die Versuche wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt: Die Stämme M 53 von N i i n i v a a r a (1955 a) und R 34 und R 55 von T e r p l a n (1962) wurden getrocknet. Mit Debaryomyces klöckeri wurde ein Versuch unternommen. Anfangs wurden die zu trocknenden Kulturen auf Agarplatten gezüchtet; um dann jedoch praktische Rohwurstbeimpfungen durchführen zu können, wurden die Keime in flüssigem Medium in einem modifizierten Gerät nach N i i n i v a a r a et al. (1963) angereichert.

3. Trocknungsarten

Die Zentrifugalgefriertrocknung wurde bei den Versuchen Nr. 1 bis 15 angewendet.

Die Versuche Nr. 16 - 21 wurden mit der Einfachtrocknung durchgeführt.

Mit dem Gefriertrocknungsapparat "Modell Regensburg" wurden die Versuche Nr. 22 - 24 angestellt.

Bei den Versuchen Nr. 25 - 28 wurde mit zwei sehr ähnlichen Laborgefrier-trocknungsanlagen gearbeitet, die je 2 l Flüssigkeit pro Trocknungsvorgang aufnehmen können.

4. Untersuchung der Keime

Es wurde immer 1 ml Keimaufschwemmung untersucht und über Trockenmassebestimmung nach der Trocknung die entsprechende Menge eingewogen und mit Aqua dest. aufgefüllt. Bei allen Versuchen wurden Keimzählungen nach dem Koch'schen Plattengußverfahren vor und nach der Trocknung sowie nach verschiedenen Lagerungszeiten durchgeführt mit jeweils 3 Platten pro Verdünnung.

Die Nitratreduktaseaktivität wurde quantitativ nach der Nitrit- und Nitratbestimmung von G r a u und M i r n a (1957) erfaßt. Dabei wurde bei den Versuchen Nr. 25 - 28 jeweils 1 ml aus der 10^{-2} Verdünnung mit 9 ml Peptonwasser (0,01 % Nitrat) 3 Std. bei 30°C bebrütet.

Bei den Versuchen bis Nr. 21 wurde nach 6 Std. bei 30°C nur Nitrit bestimmt, was aber keinen exakten Aufschluß gibt, wieweit Nitrat zu Nitrit oder weiter abgebaut worden ist.

Die Katalasebildung wurde bis zum Versuch Nr. 12 durch Messung der Sauerstoffbildung von 1 ml Keimaufschwemmung aus der 10^{-2} Verdünnung während 1 Std. bestimmt. Die jodometrische Methode nach A u t e n r i e t h und K e l l e r (1951) wurde in den Versuchen Nr. 25 - 28 durchgeführt.

5. Lagerung

Alle Proben lagerten bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß. Diese Art der Lagerung wurde gewählt, weil dabei die Keimzahlen rascher abnehmen als bei Aufbewahrung um 4°C (unter praktischen Bedingungen, z.B. im fleischverarbeitenden Betrieb, wäre auch die kühle Lagerung ohne weiteres möglich, so daß dann auch bessere Ergebnisse zu erwarten wären).

Die längste Lagerzeit betrug 45 Monate. Für eine praktische evtl. Anwendung in der Produktion genügen schon gute Lagerungsergebnisse nach höchstens 6 Monaten.

II. Versuche

Bei den einzelnen Trocknungssystemen wird auf die Methodik jeweils näher eingegangen.

1. Zentrifugalgefriertrocknung

Bei den Versuchen Nr. 1 - 15 wurde die Zentrifugalgefriertrocknung angewendet, und zwar das Modell "Speedvac" Zentrifugalgefriertrockner Typ LB 5 der Firma Edwards Hochvakuum GmbH, Frankfurt, mit der Gasballastpumpe nach Gaede, Modell D₂ der Firma Leybold, Köln. Als hygroskopisches Mittel wurde P_2O_5 verwendet. Die Trocknungszeit betrug jeweils 4 1/2 Stunden. 15 Minuten nach Anschließen des Vakuums wurde der Rotor abgestellt. Nach Abschluß der Trocknung wurden die Ampullen noch 20 Minuten am Rechen evakuiert und zugeschmolzen.

Gezüchtet wurden die Keime bei 30°C auf Standard II Agar der Firma Merck unter Zusatz von 1 % Fleischextrakt in Petrischalen mit 9 cm Durchmesser. Von den jeweils mit 3 ml Schutzlösung von der Platte abgeschwemmten Keimen wurde 1 ml in 2 ml fassende Ampullen eingefüllt und der Flüssigkeitsspiegel markiert, um bei der Rehydrierung ohne weitere Bestimmungen das entzogene Wasser wieder mit Aqua destillata ersetzen zu können.

Die Versuche sind in den Tabellen Seite 29 - 30 zusammengefaßt.

Versuch Nr. 1

Keim: Micrococcus M 53 Schutzkolloid: Magermilch
Untersuchung: Keimzahl Lagerung: 45 Monate
Ergebnis: Sehr gute Überlebensrate, fast kein Lagerungsverlust.

Versuch Nr. 2

Keimart: Micrococcus M 53 Schutzkolloid: Magermilch
Untersuchung: Keimzahl, Lagerung: 45 Monate
 Katalaseaktivität
Ergebnis: 100 % Überlebensrate, Lagerungsverlust log 1

Versuch Nr. 3

Keimart: Micrococcus M 53 Schutzkolloid: Magermilchpulver und
 Aqua dest. im Verhältnis 2 : 8
Untersuchung: Keimzahl Lagerung: 45 Monate
Ergebnis: gute Überlebensrate, Keimzahl bei der Lagerung log 6 reduziert.

Versuch Nr. 4

Keimart: Micrococcus M 53 Schutzkolloid: Magermilchpulver und
 Aqua dest. im Verhältnis 2 : 8
Untersuchung: Keimzahl, Lagerung: 45 Monate
 Katalaseaktivität
Ergebnis: geringer Verlust beim Trocknen, fast kein Lagerungsverlust.

Versuch Nr. 5

Keimart: Micrococcus M 53 Schutzkolloid: aufgeschlossenes Milch-
 eiweiß und Aqua dest. (2 : 21)
Untersuchung: Keimzahl Lagerung: 45 Monate
Ergebnis: fast keine Abnahme bei Trocknung und Lagerung.

Versuch Nr. 6

Keimart: Micrococcus M 53

Schutzkolloid: aufgeschlossenes Milcheiweiß und Aqua dest. (2 : 21)
+ 0,02 % Lecithin,

Untersuchung: Keimzahl, Katalaseaktivität

Lagerung: 45 Monate

Ergebnis: Lecithin bringt keine Verbesserung.

Versuch Nr. 7

Keimart: Micrococcus M 53

Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose

Untersuchung: Keimzahl

Lagerung: 45 Monate

Ergebnis: sehr gute Überlebensrate, über 100 %.

Versuch Nr. 8

Keimart: Micrococcus M 53

Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose

Untersuchung: Keimzahl, Katalaseaktivität

Lagerung: 45 Monate

Ergebnis: fast genau wie Versuch Nr. 7

Versuch Nr. 9 - 12

Keimart: Micrococcus M 53

Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktase- und Katalaseaktivität

Lagerung: 45 Monate

Ergebnis: Alle Versuche haben sehr gute Überlebensraten, bei Nr. 10, 11 und 12 sogar über 100 % nach dem Trocknen, ähnliche Ergebnisse bei Nitratreduktase- und Katalaseaktivität.
Die Keime im Versuch Nr. 11 sind aus unerklärlichen Gründen abgestorben.

Versuch Nr. 13

Keimart: Achromobacter-Stamm R.34

Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose

Untersuchung: Keimzahl

Lagerung: 42 Monate

Ergebnis: Keimzahl vermindert sich beim Trocknen um log 2; Lagerungsverlust gering.

Versuch Nr. 14

Keimart: Micrococcus R 55 Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose
Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität Lagerung: 43 Monate
Ergebnis: Keimzahl wird beim Trocknen um log 2 reduziert, wäre noch brauchbar.

Versuch Nr. 15

Keimart: R 55 und R 34 im Verhältnis 1:1; wie die Versuche Nr. 13 und 14 zeigen (Tabelle Seite 30), wachsen die beiden Keime etwa gleich dicht; es wurden jeweils 6 Agarplatten abgeschwemmt und die Keime vermischt.
Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose
Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität
Lagerung: 43 Monate
Ergebnis: gut, aber es läßt sich auf Grund dieser Versuchsanordnung nicht feststellen, wie das Verhältnis der Keime sich nach Trocknung und Lagerung ändert.

2. Eintrocknung

In den Versuchen Nr. 16 - 21 wurde die Eintrocknung angewandt. Die Keimschwemmungen wurden in hohen Bechergläsern in einen Exsikkator gestellt und mit der Leybold Gasballastpumpe D₂ evakuiert, und zwar bei den Versuchen Nr. 16 - 18 jeweils 8 Stunden und bei Nr. 19 - 21 nur 5 Stunden. Da das Trockengut nicht vorher eingefroren wurde, schäumte es sehr stark, so daß anfangs nur geringes Vakuum verwendet wurde, bis soviel Wasser verdunstet war, daß das Trockengut nicht mehr überschäumen konnte. Der getrocknete Schaum wurde in einer sterilen Schale zu Pulver zerrieben, in Plastikbeutel abgefüllt und diese in Vakuum verschweißt.

Leider hielten die Beutel das Vakuum nicht, so daß alle Keime abgestorben sind, bis auf Versuch Nr. 18, bei dem sie trotz Luftzutritt überlebten. Die Versuche sind in den Tabellen Seite 30 zusammengefaßt.

Versuch Nr. 16

Keimart: Achromobacter R 34
Schutzkolloid: Von großen Agarplatten (14 cm Durchmesser) wurden die Keime mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und mit 10 g Magermilchpulver vermischt.

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität

Lagerung: 41 Monate

Ergebnis: Schlechte Überlebensrate; Lagerungsfähigkeit nicht feststellbar,
da Plastikbeutel luftdurchlässig und Keime abgestorben.

Versuch Nr. 17

Keimart: Micrococcus R 55

Schutzkolloid: siehe Versuch Nr. 16

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität

Lagerung: 42 Monate

Ergebnis: Der Keim übersteht mit diesem Schutzkolloid die Trocknung gut;
durch den Luftzutritt bei der Lagerung abgestorben.

Versuch Nr. 18

Keimart: R 55 und R 34 im Verhältnis 3 : 1

Schutzkolloid: siehe Versuch Nr. 16

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität

Lagerung: 42 Monate

Ergebnis: Überlebensrate gut: trotz Luftzutritt überlebten die Keime
zu einem geringen Teil die Lagerung.

Versuch Nr. 19

Keimart: Achromobacter R 34

Schutzkolloid: Mit 10 ml Magermilch wurde abgeschwemmt und anschließend
mit 10 g Magermilchpulver vermischt.

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität

Lagerung: Die Lagerproben der Versuche Nr. 19 - 24 gingen verloren.

Ergebnis: Der R 34 übersteht mit dem Magermilchzusatz die Trocknung gut.

Versuch Nr. 20

Keimart: Micrococcus R 55

Schutzkolloid: siehe Versuch Nr. 19 Lagerung: siehe Versuch Nr. 19

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität

Ergebnis: Bei gleichen Bedingungen wie im Versuch Nr. 19 überlebten von
R 55 über 100 % die Trocknung.

Versuch Nr. 21

Keimart: R 55 und R 34 im Verhältnis 1 : 1

Schutzkolloid und Lagerung: siehe Versuch Nr. 19

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktaseaktivität

Ergebnis: Eine Überlebensrate von 66 % entspricht etwa dem Mittel aus den Versuchen Nr. 19 und 20.

3. Gefriertrocknung: Modell Regensburg

Das Modell Regensburg (Versuch Nr. 22 - 24) entspricht der Versuchsanordnung der Einfachtrocknung mit dem Unterschied, daß zwischen Exsikkator und Pumpe 2 Kühlfallen geschaltet wurden, die laufend mit CO_2 -Alkoholgemisch gekühlt wurden. Die Keimaufschwemmung wurde vorher in CO_2 -Alkoholgemisch in Bechergläsern eingefroren. Getrocknet wurde jeweils 6 Stunden; gelagert wurde wie bei der Einfachtrocknung in Plastikbeuteln. Die Ergebnisse sind auf der Tabelle Seite 31 zusammengefaßt.

Versuch Nr. 22

Keimart: Micrococcus R 55

Schutzkolloid: Jede der 9 cm Agarplatten wurde mit 2 ml Aqua dest. abgeschwemmt und die Abschwemmung mit 2 g Magermilchpulver vermischt.

Untersuchung: Keimzahl

Lagerung: 41 Monate

Ergebnis: Über 100 % Überlebensrate, Lagerungsverlust gering.

Versuch Nr. 23

Keimart: Achromobacter R 34

Schutzkolloid: siehe Versuch Nr. 22

Untersuchung: Keimzahl

Lagerung: 33 Tage

Ergebnis: Bei Trocknung Keimzahl um $\log 2$ reduziert; für die kurze Lagerungszeit von 33 Tagen ist die Abnahme sehr stark.

Versuch Nr. 24

Keimart: Debaryomyces klöckeri auf Bierwürzeagar gezüchtet

Schutzkolloid: Siehe Versuch Nr. 22

Untersuchung: Keimzahl

Lagerung: 27 Tage

Ergebnis: Debaryomyces klöckeri zeigt gute Überlebensrate, wird aber bei der Lagerung relativ rasch abgetötet.

4. Gefriertrocknung: Laboranlage

Die Gefriertrocknungsversuche wurden mit 2 sehr ähnlichen Laborgefriertrocknungsanlagen mit je einer Leistung von 2 l Wasseraufnahme pro Trocknungsvor-

gang durchgeführt, und zwar für die Versuche Nr. 25 und 26 mit dem Modell G 07 der Firma Leybold-Hochvakuum, Köln, und der Gasballastpumpe nach Gaede, Modell D, der Firma Leybold, Köln. Für die Versuche Nr. 27 und 28 wurde die Gefriertrocknungsanlage Modell L 2 von WKF/Phywe, Brandau/Darmstadt, verwendet.

Um Versuche mit größeren Keimengen durchführen zu können, waren verschiedene Vorversuche nötig.

Der Micrococcus R 55 sollte in flüssigem Medium gezüchtet werden. Dafür wurden eine Nährlösung IV von N i i n i v a a r a (1955 a) und eine von T e r p l a n (persönliche Mitteilung) zusammengestellte verglichen.

Zusammensetzung der Nährbouillon nach T e r p l a n :

1 % Fleischextrakt	0,1 % Glukose
1 % Pepton	3 % NaCl
0,5 % Trypton	0,001 % KNO_3
0,3 % Hefeextrakt	
0,1 % K_2HPO_4	
0,1 % KH_2PO_4	

Auf die Veröffentlichung eines Vergleiches der Keimzahlen wird verzichtet, da sie nicht die absoluten Werte darstellen. Nach etwa 24 Stunden setzte nämlich Schlierenbildung ein, wodurch die Keimzahlen in den Lösungen vorübergehend reduziert werden. Die Keimzahl lag jedoch bei der Bouillon nach T e r p l a n immer etwas höher als bei der nach N i i n i v a a r a und wurde daher für die Versuche verwendet.

Eine lohnende Ausbeute an Keimen war bei Züchtung in Kolben ohne Belüftung nicht zu erreichen. Dies gelang erst mit einer modifizierten Züchtungsanlage nach N i i n i v a a r a et al. (1963). Eine 25 l Wasserflasche stand in einem 30°C Wasserbad mit Thermostat. Seitlich am Grund der Flasche wurde die Nährlösung mit einer Schlauchpumpe abgesaugt und durch eine Wasserstrahlpumpe gepreßt, in der sie intensiv mit gefilterter Luft vermischt wurde und wieder in die Flasche hineingepumpt. Die Luftbläschen stiegen langsam in der Flüssigkeit auf. Die 15 l Inhalt wurden durch dieses System gut umgewälzt (etwa 2 l/Min.) und belüftet. Wenn zu starke Schaumbildung auftrat, wurde sie mit einigen Tropfen Tween 80 reduziert. Im Vorversuch blieb die laufende Anlage 8 Tage keimfrei. Nach 2 Tagen wurde die Lösung entnommen und in der "Cepa" Laboratoriumszentrifuge der Firma Carl Padberg, Lahr/Schwarzwald, bei 38000 U/Min. kontinuierlich zentrifugiert. Die im Zentrifugenzyylinder stehende Keimaufschwemmung wurde in Zentrifugengläsern getrennt. Im Homogenisator wurden die Keime mit dem jeweiligen Schutzkolloid kurz vermischt und anschlie-

Bend in Bechergläsern als 5 - 6 mm dicke Schichten im CO_2 -Alkoholgemisch eingefroren. Bei der Lyophilisation der Versuche Nr. 25 und 26 wurde während der zweiten Hälfte der Trockenzeit mit einem Wamrluftgerät beheizt. Das Trockengut wurde im Homogenisator pulverisiert, in Klarsichtbeutel eingewogen und in luftdichten Kunststoffbeuteln verschweißt.

Versuch Nr. 25

Keimart: Micrococcus R 55, Ausbeute 22 g/l Nährlösung
Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose
Trocknung: 36 Stunden mit G 07, davon 19 Stunden geheizt; das Trockengut enthielt 2 % Restfeuchtigkeit
Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktase- und Katalaseaktivität
Lagerung: 3 Monate
Ergebnis: sehr gute Überlebensrate, nach 3 Monaten über 100 % der ursprünglichen Keime.

Versuch Nr. 26

Keimart: Micrococcus R 55, Ausbeute 34 g/l
Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose
Trocknung: 36 Stunden mit G 07, davon 20 Stunden geheizt; Restfeuchtigkeit 10 %
Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktase- und Katalaseaktivität
Lagerung: 3 Monate
Ergebnis: fast genau wie Versuch Nr. 25

Versuch Nr. 27

Keimzahl: Micrococcus R 55, Ausbeute nur 6,8 g/l (weil von den 15 l nur 10 l entnommen wurden und die dicken Schlieren alle im Züchtungsgefäß blieben)
Schutzkolloid: Patent von M u g g l e t o n (1958); Magermilch + 7,5 % Glukose + 10 % Dextran (6 - 9000 Molekulargewicht) + 0,025 % Triton
Trocknung: 44 Stunden mit Modell L 2 von WKF ohne Heizen; Restfeuchtigkeit 5 %
Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktase- und Katalaseaktivität
Lagerung: 5 Monate
Ergebnis: 100 % Überlebensrate; bei Lagerung abgestorben.

Versuch Nr. 28

Keimart: Micrococcus R 55, Ausbeute 16,7 g/l

Schutzkolloid: Magermilch + 7,5 % Glukose + 5 % NaCl

Trocknung: 68 Stunden in L 2 von WKF ohne Heizen, Restfeuchtigkeit 1 %

Untersuchung: Keimzahl, Nitratreduktase- und Katalaseaktivität

Lagerung: 5 Monate

Ergebnis: wie bei Versuch Nr. 27

Anmerkungen zu der tabellarischen Zusammenfassung der Ergebnisse:

- 1) Die Keimzahl wurde über die Trockenmassebestimmung auf das ursprüngliche Volumen bezogen.
- 2) Angabe der Überlebensrate nach der Trocknung bezogen auf die frische Keimaufschwemmung.
- 3) Angabe der Überlebensrate nach der Lagerung bezogen auf die getrockneten Keime.
- 4) siehe Methodik S. 20 .

(Tabellarische Zusammenfassung siehe S. 29 ff.)

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Versuchs- nummer	Stamm	Schutzlösung	1)		gelagert (Lagerungszeit)	in % ³⁾	Nitratreduktase- aktivität Nitritbildung der Keime (in %) getrocknet (bezo- gen auf frisch)	4)	
			Keimzahl/ml frisch getrocknet	in % ²⁾				O ₂ -Bildung (in %) getrocknet (bezo- gen auf frisch)	gelagert (bezogen auf getrocknet) in %
<u>Zentrifugalgefriertrocknung</u> (siehe Seite 20 - 23)									
1.	M 53	Magermilch	$4,6 \times 10^{10}$ $4,2 \times 10^{10}$	91	45 Monate $4,1 \times 10^{10}$	98			
2.	M 53	Magermilch	$1,3 \times 10^{11}$ $1,3 \times 10^{11}$	>100	45 Monate $4,7 \times 10^{10}$			65	46
3.	M 53	Magermilch- pulver + Aqua dest. (2:8)	$3,5 \times 10^{10}$ $2,6 \times 10^{10}$	74	45 Monate 2×10^4				
4.	M 53	- " -	$1,6 \times 10^{11}$ $2,5 \times 10^{10}$	16	45 Monate $2,4 \times 10^{10}$	96		47	38
5.	M 53	Aufgeschl. Milcheiweiß + A. dest. (2:21)	$5,3 \times 10^{10}$ $3,2 \times 10^{10}$	60	45 Monate $1,7 \times 10^{10}$	53			
6.	M 53	Aufg. M.eiweiß + A. dest. (2:21) + 0,02 % Lecithin	$1,3 \times 10^{10}$ $3,3 \times 10^9$	27	45 Monate 5×10^8			46	50
7.	M 53	Magermilch + 7,5 % Glukose	3×10^{10} $3,1 \times 10^{10}$	>100	45 Monate $2,2 \times 10^6$				
8.	M 53	- " -	$1,3 \times 10^{11}$ 1×10^{11}	77	45 Monate $1,4 \times 10^7$			60	3
9.	M 53	- " -	$5,2 \times 10^{10}$ $3,5 \times 10^{10}$	67	45 Monate $3,6 \times 10^{10}$	>100	>100	70	58
10.	M 53	- " -	$5,7 \times 10^9$ $8,5 \times 10^9$	>100	45 Monate $7,2 \times 10^9$	85	176	>100	68

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse (Fortsetzung)

Versuchs- nummer	Stamm	Schutzlösung	Keimzahl/ml ¹⁾		gelagert (Lagerungszeit)	in % ³⁾	Nitratreduktase- aktivität Nitritbildung der Keime (in %) getrocknet (bezo- gen auf frisch)	Katalaseaktivität ⁴⁾ O ₂ -Bildung (in %) getrocknet (bezo- gen auf frisch)	
			frisch	getrocknet				getrocknet (bezo- gen auf getrocknet) in %	gelagert (bezogen auf getrocknet) in %
11.	M 53	Magermilch + 7,5 % Glukose	$2,6 \times 10^9$ $6,9 \times 10^9$	$\gg 100$	45 Monate abgestorben		108	75	11
12.	M 53	- " -	$5,6 \times 10^9$ $9,4 \times 10^9$	$\gg 100$	45 Monate $1,7 \times 10^5$		46	75	26
13.	R 34	- " -	$4,1 \times 10^{12}$ $2,8 \times 10^{10}$	0,7	45 Monate $1,3 \times 10^7$				
14.	R 55	- " -	1×10^{12} $4,6 \times 10^{10}$	5	43 Monate 5×10^4	11			
15.	R 55 + R 34 (1:1)	- " -	$1,1 \times 10^{12}$ $5,1 \times 10^{10}$	3	43 Monate $9,4 \times 10^9$	18	86		

Einfachtrocknung

(siehe Seite 23 - 25)

16.	R 34	4 ml NaCl + 10g MM-Pulver	$7,6 \times 10^9$ 1×10^8	1,3	41 Monate abgestorben		150		
17.	R 55	- " -	$3,5 \times 10^{10}$ $1,4 \times 10^{10}$	40	42 Monate abgestorben		85		
18.	R 55 + R 34 (3:1)	4 ml NaCl + 10g MM-Pulver	$2,7 \times 10^{10}$ $1,9 \times 10^{10}$	70	42 Monate $1,2 \times 10^3$		88		
19.	R 34	10g Magermilch + 10g MM-Pulver	$2,6 \times 10^{10}$ $4,4 \times 10^9$	17			33		
20.	R 55	- " -	$6,1 \times 10^{10}$ $8,3 \times 10^{10}$	$\gg 100$			$\gg 100$		
21.	R 55 + R 34 (1:1)	- " -	3×10^{10} 2×10^{10}	66			$\gg 100$		

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse (Fortsetzung)

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse (Fortsetzung)									
Versuchs- nummer	Stamm	Schutzlösung	1) Keimzahl/m		gelagert (Lagerungszeit)	in % ³⁾	Nitratreduktase- aktivität Nitritbildung der Keime (in%) getrocknet (bezo- gen auf frisch)	Katalaseaktivität ⁴⁾ O ₂ -Bildung (in %) getrocknet (bezo- gen auf frisch)	gelagert (bezogen auf getrocknet) in %
			frisch	getrocknet					
Gefriertrocknung: Modell Regensburg (siehe Seite 25)									
22.	R 55	1 ml A.dest. + 2 g MM-Pulver	7,4 x 10 ¹⁰ 9 x 10 ¹⁰	>100	41 Tage 5,5 x 10 ¹⁰	10 61			
23.	R 34	- " -	5 x 10 ¹⁰ 1,6 x 10 ⁸	0,3	33 Tage 7 x 10 ⁵	5 0,4			
24.	Debaryo- myces klöckeri	- " -	2,2 x 10 ¹⁰ 2,2 x 10 ⁹	10	27 Tage 4,4 x 10 ⁸	20			

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse (Schluß)

Versuchs- nummer	Stamm	Schutzlösung	1) Keimzahl/ml				4) Nitratreduktaseaktivität:				4) Katalaseaktivität	
			frisch	in % ²⁾	gelagert (Lagerungs- zeit)	in % ³⁾	Nitratreduktion der Keime (in %)		Nitritbildung der Keime (in %)		Katalasebildung der Keime (in %)	
			getrocknet				getrocknet (bezogen auf frisch)	gelagert (bezogen auf getrocknet)	getrocknet (bezogen auf frisch)	gelagert (bezogen auf getrocknet)	getrocknet (bezogen auf frisch)	gelagert (bezogen auf getrocknet)
Gefriertrocknung: Laboranlagen (siehe Seite 25 - 28)												
25.	R 55	Magermilch + 7,5 % Glukose	$2,6 \times 10^{12}$ $2,1 \times 10^{12}$	80	3 Monate $1,5 \times 10^{13}$	>100	89	38	23	40	76	59
26.	R 55	- " -	$2,2 \times 10^{12}$ $8,2 \times 10^{11}$	37	3 Monate $4,2 \times 10^{12}$	>100	73	25	29	38	83	66
27.	R 55	Magermilch, Glukose, Dex- tran, Triton	$6,2 \times 10^{11}$ $7,8 \times 10^{11}$	>100	5 Monate abgestorben		66	abgest.	61	abgest.	103	abgest.
28.	R 55	Magermilch + 7,5 % Glukose + 5 % NaCl	$1,8 \times 10^{12}$ $3,6 \times 10^{14}$	>100	5 Monate abgestorben		>100	abgest.	>100	abgest.	99	abgest.

6. Besprechung der Ergebnisse

Wie aus den einzelnen Versuchsergebnissen und der tabellarischen Zusammenfassung entnommen werden kann, ist die Überlebensrate nach Trocknung und Lagerung von den Trocknungsmethoden und von einer evtl. Vorbereitung zur Trocknung, d.h. ob aus der flüssigen oder festen Phase getrocknet wurde, im wesentlichen unabhängig. Sehr gut überstanden die grampositiven Mikrokokken M 53 und R 55 die Trocknung, während die Absterbequote bei dem gramnegativen *Achromobacter* R 34 unter gleichen Bedingungen in allen Fällen wesentlich höher lag.

Den größten Einfluß auf das Überleben hat das Schutzkolloid. Magermilch, Lösungen von Magermilchpulver und aufgeschlossenem Milcheiweiß eignen sich als Schutzlösung sehr gut. Mit Magermilch und einem Zusatz von 7,5 % Glukose, durch den die Restfeuchtigkeit nicht zu stark reduziert wird, ergeben sich direkt nach der Trocknung die besten Überlebensraten, dagegen weisen die Proben mit Magermilch allein nach längerer Lagerung günstigere Keimgehalte auf.

In 8 Versuchen (Nr. 7, 10, 11, 12, 20, 22, 27 und 28) war die Überlebensrate nach der Trocknung und in 3 Fällen (Nr. 9, 25 und 26) nach der Lagerung über 100 %. Die Nitratreduktion war in 3 Fällen (Nr. 10, 11 und 16) und die Katalaseaktivität in 2 Fällen (Nr. 10 und 27) gegenüber der frischen Kultur erhöht.

D. Diskussion

Die Anwendung von Kulturen bei der Herstellung von fermentierten Fleischwaren ist noch relativ wenig erforscht. Im idealen Fall sollten junge und aktive Zellen, also frische Kulturen zur Anwendung kommen. Dieses wäre theoretisch nur bei sehr großen Industriebetrieben möglich, in denen die Züchtung der Keime vorgenommen werden könnte.

Junge, aktive Kulturen können entweder in Form von Flüssigkulturen oder als Abschwemmungen von festen Nährböden nur kurze Zeit nach der Züchtung verwendet werden. Schon nach einer Aufbewahrungszeit von wenigen Tagen verlieren die Keime in Abhängigkeit von den Aufbewahrungsbedingungen ihre Aktivität und können außerdem absterben; auch die Vermehrung von Phagen wäre in Betracht zu ziehen. Aus diesem Grunde hat die Anwendung von Starterkulturen unter gewerblichen Bedingungen - von der oben erwähnten Ausnahme abgesehen - nur Aussicht auf Erfolg, wenn die Keime durch irgend ein Verfahren stabilisiert werden. Dazu bieten sich vor allem die verschiedenen Trocknungsverfahren an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche Trocknungsverfahren hinsichtlich der Überlebensrate der Keime nach Trocknung und Lagerung geprüft; außerdem wurde auch eine evtl. Änderung von biochemischen Eigenschaften der Keime beobachtet.

Die Schwankungen der Überlebensraten waren bei einer Keimart in wiederholten Versuchen unter gleichen Bedingungen größer als die Unterschiede, die sich bei der Anwendung der vier beschriebenen Trocknungsverfahren ergeben haben. Vermutlich sind auch bei Einhaltung definierter Versuchsbedingungen immer noch genügend - evtl. auch nicht erfassbare - Imponderabilien gegeben, durch welche diese Unterschiede bedingt werden. Dies ist wohl einer der Gründe für die verwirrende Vielzahl von Angaben hinsichtlich von Überlebensraten in der Literatur, die nicht in Übereinstimmung gebracht werden können. Bei den 28 Versuchen mit den Mikrokokkenstämmen M 53 (*N i i n i v a a r a* - 1955 a) und R 55 sowie dem *Achromobacter* R 34 (*T e r p l a n* - 1962) wurde beobachtet, daß die beiden Mikrokokkenstämme die Trocknung sehr gut vertragen, während R 34 eine wesentlich höhere Absterbequote aufweist. Dies bestätigt die Ansichten von *S t a r k* et al. (1931), *S t a m p* (1947), *P r o o m* (et al. 1949; 1951 a, b), *S c h m i d t* et al. (1958) und *F e l d m a n n* (1959), wonach jeder Bakterienart eine charakteristische Trocknungsresistenz zukommt. Möglicherweise sind hierfür die gleichen Faktoren verantwortlich zu machen, die auch bei der Erhitzung bei grampositiven gegenüber gramnegativen Keimen eine höhere Thermoresistenz bewirken.

Die von *A n n e a r* (1954), *B e r g m a n n* et al. (1957) und *T a n g u a* (1959) gegenüber dem Ausgangsmaterial schon beobachteten größeren Keimzahlen nach der Trocknung wurden bei 8 Versuchen ebenfalls festgestellt, und zwar nur

bei den Mikrokokkenstämmen. Diese scheinbare Vermehrung könnte evtl. dadurch hervorgerufen werden, daß die Bakterien vor der Trocknung in der nassen Aufschwemmung teilweise verklumpt waren, und diese Klumpen durch Konsistenzänderung des Trockengutes beim Wasserentzug zerfallen, so daß in der dann folgenden Keimzählung mehr Einzelkolonien erscheinen. Ein Grund für diese Entklumpung könnte darin gesehen werden, daß sich aufgeschlossenes Milcheiweiß zunächst nur sehr langsam in Wasser löst, während dies nach der Trocknung rasch und homogen erfolgte. In den o.a. Fällen war im übrigen die biochemische Aktivität nach Erfolg der Trocknung nie höher. Die in einigen Fällen ermittelte Erhöhung der biochemischen Aktivität wurde auch schon von J a n u s z e w i c z (1957) beschrieben. Eine Erklärung kann nicht gegeben werden.

Im übrigen scheint durch die Trocknung bzw. die Lagerung doch ein erheblicher Abfall der biochemischen Aktivität zu erfolgen, zumindest soweit er an Hand der Nitratreduktase und Katalase zu beobachten ist. Im Vergleich dazu ist die Abnahme der Keimzahlen geringer. Diese Diskrepanz könnte auch nur scheinbar bedingt sein, indem durch die Trocknung keine tatsächliche Vermehrung der Zellen erfolgt, während die biochemische Aktivität durch Strukturänderungen nicht berührt wird.

Beim Lyophilisieren von Mischkulturen ändert sich nach G r e a v e s (1960) das Mengenverhältnis. Wenn R 55 (*Micrococcus*) und R 34 (*Achromobacter*) gemeinsam getrocknet wurden, so entsprach die Keimzahl des Trockenproduktes etwa dem arithmetischen Mittel aus den Ergebnissen getrennt vorgenommener Trocknungen. Aus dieser Tatsache kann empfohlen werden, daß bei der Herstellung von Startermischkulturen die einzelnen Kulturen erst nach der Trocknung in einem bestimmten Verhältnis vermischt werden sollten.

Die Überlebensraten lassen beim Vergleich der 4 Trocknungsverfahren keine regelmäßigen Unterschiede erkennen, zumal bei allen Methoden mit Vakuum getrocknet wird und dies nach Ansicht von G r a h a m et al. (1958/59), M e r y - m a n (1959), D r e f a h l et al. (1960) und W a g m a n et al. (1963) die stärkste Noxe bei der üblichen Gefriertrocknung ist. Dies bestätigt S c h e i b n e r (1961), der die größte Keimverminderung bei der Vakuumtrocknung feststellte. Die o.a. Autoren erzielten mit der Konvektionsgefriertrocknung im Vergleich zur Vakuumtrocknung konstante und deutlich höhere Überlebensraten.

Der Einfluß der Schutzlösung beeinflusst das Überleben der Organismen beim Trocknen und Lagern am stärksten. Im übrigen muß die optimale Zusammensetzung für jede Keimart ausprobiert werden. Nach Verwendung von Magermilch wurde z.B. fast kein Lagerungsverlust festgestellt; durch zusätzlich 7,5 % Glukose überstanden zwar mehr Teile die Trocknung, aber die Zahl verminderte sich bei der Lagerung stärker.

P f ü t z n e r (1959) stellt an Starterkulturen folgende Bedingungen:

1. Absolute Reinheit der Kulturen
2. Genügend große Keimmengen
3. Einfache Verarbeitungsmöglichkeit
4. Genügend lange Haltbarkeit und Aktivität
5. Preiswürdigkeit

Mit Rücksicht auf die Preiswürdigkeit müssen aber die in Frage kommenden Keime außer ihren positiven, fermentativen Eigenschaften noch folgende Kriterien erfüllen: Sie müssen auf einem billigen Nährmedium gut wachsen und die Trocknung durch ein wirtschaftliches Verfahren mit hoher Lebensrate überstehen.

Die bis jetzt im Handel erhältlichen "Starter" sind alle Monokulturen. Wenn aber die sehr vielschichtigen bakteriologischen Vorgänge der Rohwurstherstellung nur einseitig beeinflußt werden, wie z.B. durch zuckerabbauende Keime, die zu einer sehr raschen Säuerung führen, ändert sich der Charakter der Rohwurst oder sonstiger fermentierter Fleischerzeugnisse zu stark in einer Richtung. Der *Micrococcus M 53* von N i i n i v a a r a (1955 a) besitzt allerdings schon als Monokultur mehrere positive Eigenschaften: Er beschleunigt die Umrötung, führt zu einer festeren Konsistenz und ist ein Antagonist für Fäulniserreger; seine Anwendung läßt die Aromabeeinflussung offen. Dieses Beispiel zeigt, daß man, um alle wünschenswerten Eigenschaften einer Rohwurst positiv zu beeinflussen, Keimkombinationen anwenden muß. Dies wurde schon von L e r c h e (1956) und E c k e r t (1958) empfohlen; T e r p l a n (1962) hat mit einer Kombination von Mikrokokken, *Achromobacter*, *Brevibakterien* und Hefen gute Resultate erzielt.

Für Herstellung von Trockenkulturen in größerer Menge sind die in der Arbeit angewandten Trockenverfahren mit Vakuum nicht optimal, da nur in Schichten von maximal 1 cm getrocknet werden kann, wobei die unterste Schicht auch nach langer Trockenzeit nie die gleiche poröse Konsistenz erreicht, wie die oberste. Zweifellos sind diese Erfahrungen nicht ohne weiteres auf Großanlagen übertragbar. Auf Grund der Erfahrungen von C a m p b e l l (1954, a, b) und H i s c o x (1945) mit der Sprühtrocknung von der immer mit einem gewissen Keimgehalt behafteten Milch erscheint dieses Verfahren aussichtsreich. Ohne vorheriges Zentrifugieren kann die beimpfte Nährlösung direkt im Trockenturm versprüht werden, und man kommt sehr schnell und unter absolut sterilen Bedingungen zu einem lagerfähigen Starterpräparat von konstanter Restfeuchtigkeit. T e r p l a n (persönliche Mitteilung) hat in orientierenden Versuchen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt.

E. Zusammenfassung

1. Für die Rohwurstherstellung als Starterkulturen empfohlene Mikrokokken und ein *Achromobacter*stamm wurden in 28 Versuchen der Einfachtrocknung im Vakuum und 3 Arten der Gefriertrocknung (Zentrifugaltrocknung, Modell Regensburg, Laboranlage für 2 l Wasseraufnahme) unterzogen, wobei verschiedene Schutzkolloide mit wechselnden Zusätzen angewandt wurden. Die Überlebensrate der Keime sowie gewisse fermentative, biochemische Eigenschaften (Katalase und Nitratreduktase) wurden vor und nach der Trocknung sowie nach Lagerung ermittelt. Die längsten Lagerzeiten betrugen 45 Monate.
2. Die vier Trocknungsmethoden zeigten hinsichtlich der Überlebensrate nach Trocknung und Lagerung keinen Unterschied, während sich eine deutliche Beeinflussung durch das Schutzkolloid ergab. Außerdem zeigten die Mikrokokken bessere Überlebensraten als der *Achromobacter*stamm.
3. Die Überlebensraten nach der Lagerung reichen bei entsprechend hohem Ausgangskeimgehalt für die Anwendung getrockneter Starterkulturen in der Praxis aus, und zwar auch angesichts der Schwankungen.

In 8 Versuchen war nach der Trocknung sogar eine höhere Keimzahl festzustellen als vorher, die "Überlebensrate" also höher als der Ausgangskeimgehalt. Die fermentativen Aktivitäten wurden durch die Trocknung in den meisten Fällen vermindert.

F. Literaturverzeichnis

- Altmann, R.: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den
1890 Zellen.
Veit u. Co., Leipzig 1890;
- Annear, D.I.: Preservation of bacteria.
1954 Nature 174 (1954), 359;
- Appleman, M.D., und O.H. Sears: J. Bacteriol. 52 (1946), 209;
1946 zit. nach Heckly (1961);
- Autenrieth-Keller: Quantitative Chemische Analyse.
1951 Verlag Theodor Steinkopff, 8. Auflage, 1951, S. 202;
- Baker, P.R.N.: The micro-determination of residual moisture in freeze-
1955 dried biological materials.
J. Hyg. 53 (1955), 426;
- Barth, W.: Welchen Einfluß haben p_H -Wert, Kochsalz und Nitrit auf
1960 die Bakterienflora des Rohwurstbrätes?
Vet. Med. Diss., Berlin 1960;
- Barratt, R.W., und E.L. Tatum: A simplified method of lyophilizing micro-
1950 organisms.
Science 112 (1950), 122;
- Beckett, L.G.: The effect of residual moisture in frozen-dried materials,
1954 and its measurement.
In: Biological applications of freezing and drying;
R.J.C. Harris, New York 1954;
- Benedict, R.G., J. Corman, E.S. Sharpe, C.E. Kemp, H.H. Hall und R.W. Jackson:
1958 Preservation of microorganisms by freeze-drying. I. Cell
supernatant, Naylor-Smith Solution, and salts of various
acids as stabilizers of *Serratia marcescens*.
Appl. Microbiol. 6 (1958), 401;
- Bergmann, D.E., F.E. Halleck, B.J. Mechals und R. Tenng: Characteristics
1957 of a factor protecting the viability of lyophilized Bru-
cella abortu cells.
J. Bacteriol. 74 (1957), 101;
- Berkholtz: Arb.a.d.Kaiserl. Gesundheitsamt V,1 (1889);
1889 zit. nach Feldmann (1959);

- Blum, H.: Versuche zur Konservierung von Bakterienkulturen durch
1950 Trocknen.
Vet. Med. Diss., Berlin 1950;
- Brady, B.L.: Some observations on the freeze-drying of yeasts.
1960 In: Recent Research in Freezing and Drying;
Parkes (1960);
- Brown, J.H.: The preservation of bacteria in vacuo.
1925 Abstr. Bact. 9 (1925), 8;
- Brown, J.H.: Vacuum tubes for the storage and shipment of bacteria.
1926 Science 64 (1926), 429;
- Brown, J.H.: The preservation of bacteria in vacuo II.
1932 J. Bact. 23 (1932), 44;
- Campbell, J.: Die Entwicklung der Sprühtrocknungstechnik.
1954 a Molkereiztg. 8 (1954), 511;
- Campbell, L.O.J.: Ein verbessertes Sprühtrocknungsverfahren und eine Appa-
1954 b ratur zum Eindampfen von Lösungen, Emulsionen, Suspen-
sionen und dergl.
Brit. Pat. 712746 (1954);
Ref. D.S.A. 16 (1954), 808;
- Carman, P.C.: Molekular distillation and sublimation.
1948 Trans. Faraday Soc. 44 (1948), 529;
- ten Cate, L.: De microbiologie der "geschwitzte" snijworst.
1960 a Tijdschr. voor Diergeneeskunde 85 (1960), 743;
- ten Cate, L.: Het aroma der snijworst.
1960 b Tijdschr. voor diergeneeskunde 85 (1960), 859;
- Coretti, K.: Der Keimgehalt von Gewürzen.
1955 Fleischwirtschaft 7 (1955), 305;
- Coretti, K.: Veränderung des Keimgehalts während der Reifung von
1956 Rohwurst.
Fleischwirtschaft 8 (1956), 197;
- Coretti, K.: Rohwurstfehlerfabrikate durch Laktobazillen.
1958 a Fleischwirtschaft 10 (1958), 218;
- Coretti, K.: Bakterienflora fehlerhafter Rohwürste.
1958 b Arch. Lebensmittelhyg. 9 (1958), 32;

- Coretti, K.: Gehäuftes Auftreten von Kernverfärbungen bei Rohwürsten.
1958 c Jber. Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach
(1958), 29;
- Coretti, K.: Fermentative Eigenschaften der aus Rohwurst isolierten
1958 d Laktobazillen,
Jber. Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach
(1958), 31;
- Drake, E.T.: U.S. Patent 1 685 630 (1928);
1928
- Drefahl, G., und D. Engelmann: Untersuchungen über ein einfaches Verfahren
1960 zur Gefriertrocknung nach der Mitführungsmethode.
Acta histochem. 9 (1960), 272;
- Deibel, R.H., C.F. Niven und G.D. Wilson: Microbiology of meat curing.
1961 a III. Some microbiological and related technological
aspects in the manufacture of fermental sausages.
Appl. Microbiol. 9 (1961), 156;
- Deibel, R.H., G.D. Wilson und C.F. Niven: Microbiology of meat curing.
1961 b IV. A lyophilized *Pediococcus cerevisiae* starter cul-
ture for fermented sausage.
Appl. Microbiol. 9 (1961), 239;
- Dobberstein, H.: Bakterienkonservierung: Trocknung oder Gefriertrocknung?
1960 Vakuumtechnik 9 (1960), 17;
- Eckert, H.: Versuche über die bakterielle Beeinflussung von Reifung
1958 und Aromatisierung bei Rohwürsten.
Vet. Med. Diss., Gießen 1958.
- Eiduson, S., und M. Dunn: Arch. Bioch. Biophys. 35 (1952), 146;
1952 zit. nach Feldmann (1959);
- Elser, W.J., R.A. Thomas und G.L. Steffen: The desiccation of sera and other
1935 biological products (including microorganisms) in the
frozen state with the preservation of the original qua-
lities of products so treated.
J. Immunol. 28 (1935), 433;
- Fasquelle, R., und P. Barbier: Compt. rend. soc. biol. 144 (1950), 1618;
1950 zit. nach Schmidt (1958);
- Feldmann, S.: Die biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trock-
1959 nung und Gefriertrocknung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 176 (1959), 572;

- Fey, H., und A. Dumas: Ein Gefriertrocknungsapparat für mikrobiologische Zwecke.
1960 Zbl. Bakt. I. Orig. 178 (1960), 97;
- Ficker, M.: Über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen.
1898 Z. Hyg. 29 (1898), 1;
- Flosdorf, E.W., und S. Mudd: Procedure and apparatus for preservation in "liophile" form of sera and other biological substances.
1935 J. Immunol. 29 (1935), 389;
- Flosdorf, E.W., und G.W. Webster: J. Biol. Chem. 121 (1937), 353;
1937 zit. nach Heckly, (1961);
- Flosdorf, E.W., und S. Mudd: An improved procedure and apparatus for preservation of sera, micro-organisms, and other substances - the cryochem-process.
1938 J. Immunol. 34 (1938), 469;
- Flosdorf, E.W., L.W. Hull und S. Mudd: J. Immunol. 50 (1945), 21;
1945 zit. nach Heckly (1961);
- Flosdorf, E.W.: Freeze-Drying.
1949 Reinhold, New York, 1949;
- Flosdorf, E.W.: In: Biological Application of Freezing and Drying;
1954 R.J.C. Harris (1954);
- Fry, R.M., und R.I.N. Greaves: The survival of bacteria before and after drying.
1951 J. Hyg. 49 (1951), 220;
- Fry, R.M.: The preservation of bacteria.
1954 In: Biological Application of Freezing and Drying;
R.J.C. Harris (1954);
- Germano, E.: Übertragung von Infektionskrankheiten durch die Luft.
1897 Z. Hyg. 25 (1897), 439;
- Gersh, Anatom. Record. 70 (1932), 311;
1932 zit. nach Feldmann (1959);
- Gißke, W.: Keimfreie Gewürzpräparate für die Herstellung von Fleischgerichten und Wurstwaren.
1954 Fleischwirtschaft 6 (1954), 280;
- Gißke, W.: Probleme der Rohwurstherstellung.
1956 Fleischwirtschaft 8 (1956), 176;

- Graham, R.P., A.H. Brown und W.D. Ramage:
 1958/59 U.S. Patent 2 853 979 (1958)
 U.S. Patent 2 879 600 (1959);
- Grau, R., und A. Mirna: Über die Bestimmung von Nitrit, Nitrat und Kochsalz
 1957 in Fleischwaren und Laken.
 Z. analyt. Chem. 158 (1957), 182;
- Greaves, R.I.N.: Centrifugal vacuum freezing. Its application to the
 1944 drying of biological materials from the frozen state.
 Nature 153 (1944), 485;
- Greaves, R.I.N.: In: Biol. Appl. of Freezing and Drying;
 1954 S. 87, R.J.C. Harris (1954);
- Greaves, R.I.N.: The preservation of bacteria.
 1956 Canad. J. Microbiol. 2 (1956), 365;
- Greaves, R.I.N.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 85 (1960), 723;
 1960 zit. nach Heckly (1961);
- Greaves, R.I.N.: Vacuum spray freeze-drying.
 1962 5. Gefriertrocknungstagung, Köln (1962), Vortrag 8;
- Guanieri: Zit. nach Germano, E. (1897);
 1888
- Haines, R.B.: The effect of freezing on bacteria.
 1937/38 Proc. roy. Soc. B, 124 B (1937/38), 451;
- Hammer, R.B.: J. Med. Research, 24 (1911), 527;
 1911 zit. nach Heckly 1961;
- Harris, R.J.C.: Biological Applications of Freezing and Drying.
 1954 Academic Press Inc., Publishers New York, 1954;
- Harris, R.J.C.: Freeze-drying.
 1956 Lab. Pract. 5 (1) (1956), 5;
- Hass, R.: Beobachtungen über die Haltbarkeit flüssiger und ge-
 1955 friertgetrockneter BCG-Kulturen.
 Zeitschrift für Hygiene und Infektions-Krankheiten,
 Band 144;
- Haynes, W.C., L.J. Wickerham und C.W. Hesseltine: Maintenance of cultures
 1955 of industrially important microorganisms.
 Appl. Microbiol. 3 (1955), 361;

- Heckly, R.J., A.W. Anderson und M. Rockenmacher:
1958 Lyophilization of *Pasteurella pestis*.
Appl. Microbiol. 6 (1958), 255;
- Heckly, R.J., K. Faunce, Jr. und S.S. Elberg:
1960 Lyophilization of *Brucella melitensis*.
Appl. Microbiol. 6 (1960), 52;
- Heckly, R.J.:
1961 Preservation of bacteria by lyophilization.
Adv. in Appl. Microbiol. 3 (1961), 1;
- Heim, L.:
1905 Die Widerstandsfähigkeit verschiedener Bakterienarten gegen Trocknung und die Aufbewahrung bakterienhaltigen Materials insbesondere beim Seuchendienst und für gerichtlich-medizinische Zwecke.
Z. Hyg. 50 (1905), 123;
- Heim, L.:
1907 Über Pneumokokken.
Dt. Med. Wschr. 33 (1907);
- Heller, G.:
1941 A quantitative study of environmental factors involved in the survival and death of bacteria in the desiccated state.
J. Bact. 41 (1941), 109;
- Hille, J.:
1937 Der Keimgehalt der Gewürze Majoran, weißer Pfeffer, Nelken und seine Bedeutung in der Wurstfabrikation.
Vet. Med. Diss., Berlin 1937, Nr. 1 872;
- Hiscox, E.R.:
1945 J. Dairy Res. 14 (1945), 175;
zit. nach Heckly (1961);
- Hobbing, E.:
1935 Tierärztl. Rdsch. 41 (1935), 253;
zit. nach Schönberg (1952 b);
- Hörter, R.:
1957/58 Überlebensraten von Bakterien nach der Hochvakuumgefriertrocknung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 171 (1957/58), 526;
- Hörter, R.:
1960 Überlebensraten von gefriergetrockneten Bakterien nach zweijähriger Lagerung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 178 (1960), 364;
- Hornibrook, J.W.:
1950 J. Lab. Clin. Med. 35 (1950), 788;
zit. nach Heckly (1961)

- Hruby, S., P. Maresova und L. Peleck: Wirkung der Gewürze auf die Mikroflora
1959 der Lebensmittel.
Prumysl patravín 8 (1959), 417;
- Hutton, R.S., R.J. Hilmo und J.L. Roberts: Some physical factors that
1951 influence the survival of *Brucella abortus* during freeze-
drying.
J. Bacteriol. 61 (1951), 309;
- Januszewicz, I.: Acta Microbiol. Polon. 6 (1957), 367;
1957
- Jensen, L.B., und L. Paddock: U.S. Patent 2 225 783 (1940);
1940
- Keller, H.: Bakterielle Veränderungen an Würsten.
1953 Fleischwirtschaft 5 (1953), 167;
- Keller, H.: Die bakterielle Aromatisierung der Rohwurst.
1954 a Fleischwirtschaft 6 (1954), 125;
- Keller, H., und E. Meyer: Bakterielle Aromatisierung der Rohwurst.
1954 b Fleischwirtschaft 6 (1954), 453;
- Keller, H.: Versuche zur bakteriellen Aromatisierung der Rohwurst.
1955 Ann. Inst. Pasteur 7 (1955), 235;
- Kirsop, B.: Maintenance of yeasts by freeze-drying.
1955 J. Inst. Brew. 61 (1955), 466;
- Kirstein, F.: Z. Hyg. 35 (1900), 123;
1900 zit. nach Feldmann (1959);
- Kohnle, K.: Untersuchung über aromabildende und halophile Bakte-
1953 rien in der Rohwurst.
Vet. Med. Diss., Gießen 1953;
- Kotter, L., und O. Prändl: Physikalisch-chemische Vorgänge bei der Fabri-
1958 kation schnittfester Rohwürste.
Fleischwirtschaft 10 (1958), 26;
- Kurk, F.W.: U.S. Patent 1 380 068 (1921);
1921
- Leach, R.H., und W.J. Scott: The influence of rehydration on the viability
1959 of dried micro-organisms.
J. Gen. Microbiol. 21 (1959), 295;

- Leifson, E.: The preservation of bacteria by drying in vacuo.
1936 *Am. J. Hyg.* 23 (1936), 231;
- Lerche, M.: Keimfreie Gewürze.
1953 *Fleischwirtschaft* 5 (1953), 27;
- Lerche, M.: Mikrobiotische Vorgänge bei der Rohwurstreifung.
1956 *Fleischwirtschaft* 8 (1956), 752;
- Lerche-Goerttler-Rievel: Lehrbuch der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung.
1957 3. Auflage, Verlag Schaper, Hannover (1957);
- Fa. Leybold: Erleichterung der Gefriertrocknung von Flüssigkeiten
1962 durch Zusatz von Gelstoffen.
Dt. Patent 1 128 812/ 82 a 1/05 (1962);
- Loewus, F.A., R.P. Graham und S. Kelly: Use of stored dehydrated bacteria
1960 as reagents for the degradation of C¹⁴-labeled sugars.
Appl. Microbiol. 8 (1960), 238;
- Losem, P.: Versuche zur Verbesserung von Dauerwurst durch Aroma-
1956 bakterien.
Vet. Med. Diss., Gießen 1956;
- Luyet, B.J.: In: Biological Appl. of Freezing and Drying, S. 77;
1951 Drying, S. 77; R.J.C. Harris (1954);
- Luyet, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 84 (1960), 549;
1960 a zit. nach Heckly (1961);
- Luyet, B.J.: In: Recent research in freezing and drying.
1960 b S. 3; A.S. Parkes (1960);
- Maister, H.G., V.F. Pfeiffer, W.M. Bogart und E.N. Hegger:
1958 Survival during storage of *Serratia marcescens* dried
by continuous vacuum sublimation.
Appl. Microbiol. 6 (1958), 413;
- Meryman, H.T.: Sublimation freeze-drying without vacuum.
1959 *Science* 130 (1959), 628;
- Meryman, H.T.: Physical limitations of the rapid freezing method.
1957 *Proc. roy. Soc. B*, 147 B (1957), 452;
- Meyer, E.: Versuche zur bakteriellen Aromatisierung von Rohwürsten.
1954 *Vet. Med. Diss.*, Gießen 1954;
- Miller, C.P., und D. Schad: *J. Bacteriol.* 47 (1944), 71;
1944 zit. nach Heckly (1961);

- Miller, R. Jr., und K. Goodner: Studies on the stability of lyophilized BCG
1953 vaccine.
Yale J. Biol. and Med. 25 (1953), 262;
- Muggleton, P.W., und J. Ungar: Dt. Patent 1 028 739 (1958);
1958
- Muggleton, P.W.: Freeze-drying of bacteria with special reference to BCG.
1960 In: Recent Research in Freezing and Drying; Parkes (1960);
- Naylor, H.B., und P.A. Smith: Factors affecting the viability of *Serratia mar-*
1946 *censcens* during dehydration and storage.
J. Bacteriol. 52 (1946), 565;
- Nei, T.: In: Recent Research in Freezing and Drying;
1960 S. 78; Parkes (1960);
- Neumann, K.: Grundriß der Gefriertrocknung.
1955 a 2. Auflage, Musterschmidt Wiss. Verlag Göttingen (1955);
- Neumann, K.: Gefriertrocknung von Microorganismen, Zellen und Geweben.
1955 b Vacuum-Technik 3 (1955), 130;
- Neumann, K.: Fortschritte in der Methodik und Anwendung der Gefrier-
1957 trocknung.
Chemie-Ingenieur-Technik 29 (1957), 267;
- Niinivaara, F.P.: Über den Einfluß von Bakterienreinkulturen auf die Rei-
1955 a fung und Umrötung der Rohwurst.
Acta Agraria Fennica 85 (1955);
- Niinivaara, F.P.: Über den Einfluß von Bakterienreinkulturen auf die Rei-
1955 b fung und Umrötung der Rohwurst.
Fleischwirtschaft 7 (1955), 603;
- Niinivaara, F.P., und S.M. Pohja: Über die Reifung der Rohwurst. I. Die Verän-
1956 derung der Bakterienflora während der Reifung.
Z. Lebensm. Unters. 104 (1956), 413;
- Niinivaara, F.P., und S.M. Pohja: Erfahrungen bei der Herstellung von Roh-
1957 a wurst mit Bakterienreinkulturen.
Fleischwirtschaft 9 (1957), 789;
- Niinivaara, F.P., und S.M. Pohja: Über die Reifung der Rohwurst. II. Aus Roh-
1957 b wurst isolierte Bakterienstämme und ihre Bedeutung beim
Reifungsprozeß.
Z. Lebensm. Unters. 106 (1957), 187;

- Niinivaara, F.P., und M.S. Pohja: Die in der Rohwurst vorkommenden Bakterien
1957 c und ihre Bedeutung beim Reifungsprozeß.
Fleischwirtschaft 9 (1957), 264;
- Niinivaara, F.P., und H. Sederholm: Über die kontinuierliche Züchtung von
1963 Microorganismen.
IX. Europäischer Kongress der Fleischforscher,
Budapest 1963, Bericht Nr. 12;
- Niinivaara, F.P., M.S. Pohja und S.E. Komulainen:
1964 Some aspects about using bacterial pure cultures in the
manufacture of fermented sausages.
Food Technology 18, No. 2 (1964), 25;
- Niven, C.F., R.H. Deibel und G.D. Wilson: The use of pure culture starters
1955 in the manufacture of summer sausage.
American Meat Institute Annual Meeting (1955);
- Niven, C.F., R.H. Deibel und G.D. Wilson: The AMIE sausage starter culture.
1958 American Meat Institute Foundation Circular No 41,
January 1958;
- Nymon, M.C., I.C. Gunsalus und W.A. Gortner: An Application of the lyophile
1945 process to the maintenance of cultures for microbiological
assay.
Science 102 (1945), 125;
- Otten, L.: Z. Hyg. 107 (1927), 677;
1927 zit. nach Feldmann (1959);
- Otten, L.: Die Trockenkonservierung von pathogenen Bakterien.
1930 Zbl. Bakt. I. Orig. 116 (1930), 199;
- Parkes, A.S., und A.U. Smith: Recent Research in Freezing and Drying.
1960 Blackwell Scientific Publication, Oxford 1960;
- Pfützner, W.: Die kontrollierte Fermentierung von Fleischwaren,
1959 insbesondere Rohwurst.
Fleischwirtschaft 11 (1959), 464;
- Plank, R.: Handbuch der Kältetechnik, Bd. X, S. 86
1960 Springer-Verlag (1960);
- Pohja, M.S., und F.P. Niinivaara: Über die Reifung der Rohwurst. III. Über die
1957 antagonistische Wirkung eines Mikrokokkenstammes gegen die
in der Rohwurst vorkommenden Bakterienstämme.
Z. Lebensm.-Unters. 106 (1957), 298;

- Pohja, M.S.: Micrococci in fermented meat products.
1960 Acta Agralia Fennica 96 (1960);
- Pohja, M.S., und F.P. Niinivaara: Eigenschaften und Bedeutung der in Roh-
1964 wurst und in Pökellake vorkommenden Fett abbauenden
Bakterien.
Fleischwirtschaft 44 (16) (1964), 435;
- Precht, H., J. Christophersen und H. Hensel: Temperatur und Leben.
1955 Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955);
- Proom, H., und L.M. Hemmos: The drying and preservation of bacterial
1949 cultures,
J. Gen. Microbiol. 3 (1949), 7;
- Proom, H.: Some of the factors affecting the viability of
1951 a bacterial cultures subjected to the freeze-drying
process.
In: Biol. Appl. of Freezing and Drying;
S. 117, R.J.C. Harris (1954);
- Proom, H.: The effect of cold on microorganisms.
1951 b The problems of freeze-drying.
Proc. Soc. Appl. Bacter. 14 (1951), 261;
- Reichel, J.: U. S. Patent 2 066 302 (1936);
1936 zit. nach Heckly (1961);
- Rey, L. R.: Influence of the preliminary freezing period and
1962 adsorption phenomena in freeze-drying.
5. Gefriertrocknungstagung, Köln 1962;
- Rhian, M., H.G. Maister und R.S. Hutton: A continous freeze drier for
1957 laboratory studies.
Appl. Microbiol. 5 (1957), 323;
- Rhodes, H.E.: The effect of storage on viability of lyophilized
1958 cultures of bacteria, viruses, yeats and molds.
Amer. J. vet. Res. 19 (1958), 765;
- Rievel, H.: Mündl. Mitteilung;
1954
- Rogers, L.A.: The preservation of dried cultures.
1914 J. Infect. Dis. 14 (1914), 100;

- Rowe, T.W.G.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 85 (1960), 641;
1960 zit. nach Heckly 1961;
- Sant, R.K., und W.H. Peterson: Factors affecting loss of nitrogen and fermenting power of rehydrated active dry yeast.
1958 Food Technol. 12 (1958), 359;
- Scheer, K.E.: Ein einfaches Laboratoriumsgerät zum Gefriertrocknen.
1952/53 Zbl. Bakt. I. Orig. 159 (1952/53), 311;
- Scheibner, E.: Einfluß von Trocknungsmethode und Restfeuchtigkeit auf die Überlebensrate und die Lagerungsstabilität getrockneter *Brucella abortus*- und *Salmonella abortus ovis*-Kulturen.
1961 Vet. Med. Diss., Berlin 1961;
- Schmidt, B., S. Feldmann und H. Dobbenstein: Untersuchungen zur Frage der Änderung der biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trocknung und Gefriertrocknung.
1958 Zbl. Bakt. I. Orig. 172 (1958), 573;
- Schönberg, F.: Zur Anwendung von UV-Entkeimungslampen zur Abtötung in der Fleischwirtschaft vorkommender Bakterien und Schimmelpilze.
1952 a *Lebensmitteltierarzt 3 (1952), 65;
- Schönberg, F.: Über die Bedeutung bakterienhaltigen Gewürze für das Verderben von Wurstwaren und Fleischkonserven und zur Keimverminderung in Gewürzen durch UV-Entkeimungslampen.
1952 b Fleischwirtschaft 4 (1952), 132;
- Schormüller, J.: Fermentativ bedingte Reifungsvorgänge.
1954 Dt. Lebensmittelrdsch. 50 (1954), 24;
- Schormüller, J. und M. Schilling: Weitere Untersuchungen über die Nitratreduktase verschiedener an der Reifung von Rohwurst beteiligter Mikroorganismen.
1963 Z. Lebensm.-Unters. 118 (1963), 492;
- Scott, W.J.: The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage.
1958 J. Gen. Microbiol. 19 (1958), 624;
- Shackell, L.F.: An improved method of desiccation, with some applications to biological problems.
1909 Am. J. Physiol. 24 (1909), 325;
- Simon, E.M., K.L. Stahl und J.B. Wilson: Preservation by fr

- Simon, E.M., K.L. Stahl und J.B. Wilson: Preservation by freeze-drying and the stability of virulence of *Salmonella typhimurium*.
1963 Appl. Microbiol. 11 (1963), 371;
- Skovgaard, N.: Kemiske og mikrobiologiske fund i normale og fejlbehandlede polser.
1963 (Chemische und mikrobielle Befunde bei normal und fehlerhaft bereiteten Würsten.)
Nordisk. Vet. Med. 15 (1963), 512;
- Speck, M.L., und R.P. Meyers: The viability of dried skimmilk cultures of *Lactobacillus bulgaricus* as affected by the temperature of reconstitution.
1946 J. Bact. 52 (1946), 657;
- Stamp, L.: The Preservation of bacteria by drying.
1947 J. Gen. Microbiol. 1 (1947), 251;
- Stark, C.N., und B.L. Herrington: The drying of bacteria and the viability of dry bacterial cells.
1931 J. Bact. 21 (1931), 13;
- Stein, C.D.: Some observations on the longevity of lyophilized biological material.
1954 Vet. Med. (amer.) 49 (1954), 469;
- Stephenson, J.L.: Fundamental physical problems in the freezing and drying of biological materials.
1960 In: Recent Research in Freezing and Drying; S.121;
Parkes 1960;
- Stille, B.: Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen.
1948/50 Arch. Mikrobiol. 14 (1948/50), 554;
- Stillmann, J.W.: Anal. Chem. 23 (1951), 1058;
1951 zit. nach Heckly (1961);
- Stockton, J.J., und J.P. Newman: Cornell Vet. 40 (1950), 377;
1950 zit. nach Heckly (1961);
- Straka, R.P., und J.L. Stokes: Metabolic injury to bacteria at low temperatures.
1959 J. Bacteriol. 78 (1959), 181;
- Swift, H.F.: Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying.
1921 J. Exper. Med. 33 (1921), 69;

- Swift, H.F.: A simple method for preserving bacterial cultures by freezing and drying.
1937 J. Bact. 33 (1937), 411;
- Tanguay, A.E.: Preservation of microbiological assay organisms by direct freezing.
1959 Appl. Microbiol. 7 (1959), 84;
- Terplan, G.: Biologische, chemische und physikalische Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren. Habilitationsschrift, München 1962;
- Wagman, J., und E.J. Weneck: Preservation of bacteria by circulating-gas freeze drying.
1963 Appl. Microbiol. 11 (1963), 244;
- Wasserman, A.E., und W.J. Hopkins: Studies in the recovery of viable cells of freeze-dried *Serratia marcescens*.
1957 Appl. Microbiol. 5 (1957), 295;
- Wasserman, A.E., und W.J. Hopkins: Effect of freeze-drying on some enzyme systems of *Serratia marcescens*.
1958 Appl. Microbiol. 6 (1958), 49;
- Watts, P.S.: The effect of humidity on the survival of dried cultures of *Streptococcus agalactiae*.
1945 J. Path. and Bact. 57 (1945), 191;
- Weiser, R.S., und L.A. Hennem: Studies on the death of bacteria by drying.
1947 I. The influence of in vacuo drying, from the frozen state and from the liquid state on the initial mortality and storage behavior of *Escherichia coli*.
J. Bact. 54 (1947), 17;
- Weiss, F.A.: In: Manual of Microbiological Methods; S. 101;
1957 H.J. Conn (1957), MacGraw-Hill, New York;
- Wellhäuser, R.: Untersuchungen über einige mikrobielle Vorgänge bei der Rohwurstherstellung. Beeinflussung von Muskel-Farbstoff, Muskel-Eiweiß und Fett durch Rohwurstkeime. Vet. Med. Diss., München 1963;
- Wettach, D.: Hefen bei Fleisch- und Wurstwaren.
1955 Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1955), 270;
- Wickerham, L.J., und M.H. Flickinger: Viability of yeasts preserved two years by the lyophil process.
1946 Brew. Dig. 21 (1946), 55;

Willits, C.O.: Anal. Chem. 23 (1951), 1058;
1951 zit. nach Heckly 1961.

Lebenslauf

Als Sohn des ORVR Dr. Walter Dieterich und seiner Ehefrau Hella, geb. Mayer, wurde ich am 11.7.1936 in Welzheim/Württemberg geboren.

Nach Besuch der Volksschule und Oberschule bis zur 6. Klasse in Welzheim legte ich Ostern 1957 am Realgymnasium Schorndorf das Abitur ab.

Im Februar 1962 beendete ich mit dem Staatsexamen mein tiermedizinisches Studium in München und erhielt nach der Praktikantenzeit am 15.9.1962 die Bestallung als Tierarzt.

Anschließend war ich als Praxisvertreter und 8 Monate als Beschau-tierarzt am Schlachthof München tätig.

Seit 1.5.1964 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Universität München angestellt.

Herrn Professor Dr. L. K o t t e r danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Universitätsdozent
Dr. G. T e r p l a n für die Betreuung der
Arbeit und sein immer freundliches Entgegen-
kommen.



